

Medizinische Fakultät
der
Universität Essen

Aus dem Zentrum für Innere Medizin
Abteilung für Kardiologie

**Charakterisierung von Thrombozytenfunktion und
Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen im Rahmen von
Koronarinterventionen unter einer Therapie mit Clopidogrel**



Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung eines Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Essen

Vorgelegt von
Christoph Altmann
aus Wanne-Eickel (Herne)

2001

Dekan: Prof. Dr. med. H. Grosse-Wilde
1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. med. M. Haude
2. Gutachter: Prof. Dr. med. N. Müller

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2001

Eigene Publikationen zum Thema:

Originalarbeiten:

Altmann, C., Welge, D., Haude, M., Vonnahme, J., Volbracht, L., Tschöpe, D., Erbel, R. (2001): Characterization of platelet receptor expression and platelet-leukocyte interaction during clopidogrel treatment in patients undergoing coronary intervention. (Zur Veröffentlichung eingereicht).

Kongressbeiträge:

Altmann, C., Welge, D., Vonnahme, J., Wieneke, H., Böyükbas, D., Tschöpe, D., Haude, M. (2000): Hemmung der ADP-induzierten Thrombozyten-Leukozyten-Interaktion durch Clopidogrel. Z. Kardiol. 89 (Suppl.), 763.

Altmann, C., Haude, M., Welge, D., Vonnahme, J., Herrmann, J., Wieneke, H., Böyükbas, D., Tschöpe, D., Erbel, R. (2000): Reduction of platelet-leukocyte interaction by inhibition of platelet activation after intake of clopidogrel in patients with coronary artery disease. Eur. Heart. J. 21 (Suppl.), 3579.

Welge, D., Haude, M., **Altmann, C.**, Vonnahme, J., Herrmann, J., Wieneke, H., Böyükbas, D., Volbracht, L., Tschöpe, D., Erbel, R. (2000): Reduction of platelet aggregation by decreased expression of activated GP IIb/IIIa receptors in coronary artery disease patients treated with clopidogrel. Eur. Heart. J. 21 (Suppl.), 3541.

Altmann, C., Haude, M., Welge, D., Vonnahme, J., Wieneke, H., Volbracht, L., Erbel, R. (2001): Accelerated inhibition of platelet activation and aggregation after administration of clopidogrel compared to ticlopidine in patients undergoing coronary intervention. J. Am. Coll. Cardiol. 37 (Suppl.), 32A.

Altmann, C., Welge, D., Haude, M., Vonnahme, J., Wieneke, H., Volbracht, L., Erbel, R. (2001): Flow cytometric characterization of platelet function and platelet-leukocyte interactions under treatment with clopidogrel in the course of coronary intervention. J. Am. Coll. Cardiol. 37 (Suppl.), 223A.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	2
2	Hintergrund.....	3
2.1	Thrombozytenmorphologie und Thrombozytenfunktion.....	3
2.2	Thrombozytenoberflächenrezeptoren	8
2.3	Thrombozyten und plasmatische Gerinnung	15
2.4	Thrombozyten und Atherosklerose.....	16
2.5	Thrombozytenfunktion und Koronarintervention.....	17
2.6	Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen	18
2.7	Thrombozytenaggregationshemmer	20
3	Zielsetzung der Arbeit	29
3.1	Fragestellungen	29
4	Methodik.....	30
4.1	Studienkollektiv.....	30
4.2	Therapie mit Clopidogrel.....	31
4.3	Koronarangiographie und -intervention.....	31
4.4	Blutentnahmen und Probenaufarbeitung.....	32
4.5	Durchflusszytometrische Thrombozytenfunktionsdiagnostik.....	33
4.6	Aggregometrie.....	41
4.7	Weitere Laboranalysen.....	42
4.8	Datenauswertung und Statistik	43
5	Ergebnisse.....	44
5.1	Patientencharakteristika.....	44
5.2	Behandlungsverlauf im untersuchten Patientenkollektiv.....	45
5.3	Thrombozytenrezeptorexpression und TLA-Bildung vor Therapiebeginn	47
5.4	Einflussgrößen der Rezeptorexpression und der TLA-Bildung.....	49
5.5	Thrombozytenrezeptorexpression und TLA-Bildung unter Clopidogrel	52
5.6	Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel.....	58

5.7	Blutbildanalyse und plasmatische Gerinnung unter Clopidogrel.....	61
5.8	Einflussgrößen der Rezeptorexpression, TLA-Bildung und Aggregation	62
5.9	Einfluss der Intervention auf Rezeptorexpression, TLA-Bildung und Aggregation	64
6	Diskussion	66
6.1	Koronarintervention und reaktive Thrombozytenaktivierung.....	66
6.2	Koronarintervention und Entzündungsreaktionen	68
6.3	Clopidogrel und Thrombozytenfunktion	69
6.4	Koronarinterventionen unter Einsatz von Clopidogrel	73
6.5	Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik	74
6.6	Limitationen der Arbeit	77
6.7	Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	78
6.8	Perspektiven	79
7	Zusammenfassung.....	80
8	Literaturverzeichnis.....	81

Abkürzungen:

AA: Arachidonsäure

ABC: Antikörperbindungskapazität (*antibody binding capacity*)

AC: Adenylatzyklase

ADP: Adenosindiphosphat

AS: Aminosäure

ASS: Acetylsalicylsäure

ATP: Adenosintriphosphat

cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat

CD: Cluster of Differentiation

DAG: Diazykglyzerid

DFZ: Durchflusszytometrie

DTS: dichtes tubuläres System

FITC: Fluoresceinisothiocyanat

GP: Glykoprotein

MoAb: Monoklonaler Antikörper

MPV: Mittleres Thrombozytenvolumen (*mean platelet volume*)

OCS: offenes kanikuläres System (*open canicular system*)

PAF: Plättchenaktivierender Faktor

PDGF: Plättchen-generierter Wachstumsfaktor (*platelet derived growth factor*)

PE: Phycoerythrin

PF: Plättchenfaktor

PG: Prostaglandin

PKC: Proteinkinase C

PLC: Phospholipase C

PMN: Polymorphnukleärer Neutrophiler

PPP: Plättchenarmes Plasma (*platelet poor plasma*)

PRP: Plättchenreiches Plasma (*platelet rich plasma*)

PSGL: P-Selektin Glykoprotein Ligand

PTCA: perkutane transluminale Koronarangioplastie

SCS: Oberflächengebundenes System (*surface connected system*)

TG: Thromboglobulin

TLA: Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion

TRAP: Thrombin Rezeptor aktivierendes Peptid

TxA: Thromboxan A

VWF: von Willebrand Faktor

1 Einleitung

Thrombembolische Ereignisse stellen eine entscheidende Komplikation der koronaren Atherosklerose dar. Die Ausbildung intrakoronarer Thromben ist als Hauptursache akuter Myokardischämien anzusehen, die auf dem Boden atherosklerotischer Gefäßwandveränderungen entstehen und das Gefäßlumen partiell oder komplett verschließen können. Auslöser dieser thrombotischen Ereignisse sind entweder die spontane Ruptur einer lipidreichen Plaque oder Verletzungen des koronaren Gefäßbettes, die durch perkutane transluminale Revaskularisationsmaßnahmen induziert werden (50, 52, 80). Die Thrombozytenadhäsion und die Aggregation aktivierter Thrombozyten über Fibrinogenbrücken spielen eine zentrale Rolle im Hämostaseprozess, der zur Ausbildung intraluminaler Thromben im arteriellen Gefäßbett führen kann. Während eine intravaskuläre Thrombozytenaktivierung das Risiko eines akuten Gefäßverschlusses mitbestimmt, spielt sie beim Progress der koronaren Atherosklerose eine eher untergeordnete Rolle.

Die antithrombotische Therapie ist von entscheidender Bedeutung bei der Behandlung akuter Koronarsyndrome wie der instabilen Angina pectoris oder dem akuten Myokardinfarkt. Daneben stellen die antithrombotische und adjuvante antiaggregatorische Therapie ein wichtiges Therapieprinzip bei der Behandlung epikardialer Koronarstenosen mittels interventioneller Revaskularisationsmaßnahmen dar. Zunehmende Erkenntnisse über die Mechanismen der Thrombozytenaktivierung und die funktionelle Bedeutung membrangebundener Thrombozytenrezeptoren führten zum besseren Verständnis der Thrombozytenfunktion im Hämostaseprozess und zur Entwicklung neuer, die Thrombozytenaggregation spezifisch hemmender Substanzen. Diese werden erfolgreich bei der Therapie des akuten Koronarsyndroms und zur Sekundärprophylaxe kardialer ischämischer Ereignisse nach Koronarinterventionen eingesetzt.

Im ersten Teil der Arbeit werden Aspekte der Thrombozytenfunktion, der Bedeutung thrombozytärer Membranrezeptoren und der Thrombozytenadhäsion an Leukozyten im zellulären Hämostaseprozess in Form einer kurzen Übersicht dargestellt. Darüber hinaus wird auf die Möglichkeiten einer pharmakologischen Hemmung der Thrombozytenfunktion und die Möglichkeiten laborchemischer Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik eingegangen. Im zweiten Teil der Arbeit werden die Ergebnisse eigener laborchemischer Untersuchungen zur Charakterisierung von Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen unter einer Therapie mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel im Rahmen elektiver Koronarinterventionen dargestellt und diskutiert.

2 Hintergrund

Die Aktivierung zirkulierender Thrombozyten ist Teil des zellulären Hämostaseprozesses, der dem physiologischen Wundheilungsprozess nach Gefäßwandverletzungen vorausgeht. Zirkulierende Thrombozyten erzielen durch Adhäsion und Aggregation eine schnelle Abdichtung der verletzten Gefäßwand und tragen zur Aktivierung des plasmatischen Gerinnungssystems bei. Der erste Schritt im Prozess der zellulären Hämostase ist die Adhäsion von Thrombozyten an subendotheliale Matrixsubstanzen, die durch die Verletzung des Endothels freigelegt werden. Eine Adhäsion an ein intaktes Gefäßendothel findet nur in sehr geringem Ausmaß statt. Der Adhäsionsprozess wird über verschiedene, auf der Thrombozytenoberfläche lokalisierte Glykoproteinrezeptoren vermittelt. Hierzu zählen der von-Willebrand Rezeptorkomplex und weitere membrangebundene Rezeptoren, die den Gruppen der Integrine und der Nicht-Integrine zugeordnet sind (siehe 2.2). Auch der quantitativ und funktionell bedeutendste Thrombozytenrezeptor GP IIb/IIIa ist am Adhäsionsprozess beteiligt, spielt hier jedoch nur eine untergeordnete Rolle. Tiefe Gefäßwandverletzungen sowie die Freisetzung von Lipidsubstanzen aus dem Kern atherosklerotischer Plaques führen zu einer vermehrten Freisetzung von Gewebsthromboplastin, das die Bildung von Thrombin über den extrinsischen Weg der plasmatischen Gerinnungskaskade induziert und zur Aktivierung zirkulierender Thrombozyten beiträgt. Die Adhäsion stellt den Ausgangspunkt der Thrombozytenaktivierung dar, die über intrazelluläre Aktivierungsmechanismen zum Gestaltwandel der Zelle, der Freisetzung intrazytoplasmatisch gespeicherter Substanzen und schließlich zur Zellaggregation über Fibrinogenbrücken führt (44).

Das Endothel synthetisiert Faktoren, die in das Gefäßlumen abgegeben werden und der Thrombozytenaktivierung entgegenwirken. Hierzu zählen das Prostazyklin, das Stickstoffmonoxid (NO) und das Heparin, das die Thrombozytenaktivierung indirekt über eine Hemmung der Thrombinaktivität beeinflusst (44). Im atherosklerotisch veränderten Gefäßsystem erfahren diese physiologischen Mechanismen der Hämostase jedoch eine pathologische Komponente, da ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen entsteht. So ist zum Beispiel die NO-Synthese des atherosklerotisch veränderten Gefäßendothels gestört. Auch führt die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque zur starken lokalen Exposition prothrombogen wirkender Substanzen.

2.1 Thrombozytenmorphologie und Thrombozytenfunktion

Die kernlosen Thrombozyten sind die kleinsten zellulären Elemente des Blutes. Sie werden in den Megakaryozyten des Knochenmarks unter Einwirkung des Wachstumsfaktors Thrombopoetin gebildet. Jede dieser größten aller Knochenmarkszellen bringt etwa 500 Thrombozyten hervor. Im Flüssiggleichgewicht befinden sich ca. 30% der zirkulierenden Thrombozyten in der Milz und ca. 10% in einem schnell mobilisierbaren intravaskulären Pool. Die Thrombozytenkonzentration im Blut

beträgt 150.000-450.000 / μl . Ihre mittlere Lebensdauer beträgt ca. 8 Tage (maximal 10 Tage) und ihr Abbau erfolgt vorwiegend in der Milz durch Makrophagen. Die Aufgaben der Thrombozyten im Hämostaseprozess sind eng mit ihren morphologischen Charakteristika und den zellulären Aktivierungsmechanismen assoziiert.

2.1.1 Morphologie der Thrombozyten

Unstimulierte Thrombozyten zirkulieren in einer diskoiden Ruheform. Diese sogenannten Diskozyten weisen einen mittleren Durchmesser von 1-3 μm , ein Volumen von 4-8 fl und ein Gewicht von etwa 10 pg auf. Aktivierte Thrombozyten runden sich ab und bilden längliche Pseudopodien aus. Die Stimulation ruhender Thrombozyten führt innerhalb weniger Sekunden zum Formwandel („shape change“) und zur Zellaggregation. Elektronenmikroskopische Untersuchungen und die Ultrastrukturforschung halfen, die funktionellen Eigenschaften der verschiedenen Thrombozytenbestandteile im Prozess der Zellaktivierung und der Aggregation besser zu charakterisieren.

Plasmamembran

Die Plasmamembran ruhender Thrombozyten weist eine geordnete Verteilung der Membranphospholipide auf, die durch die Zellaktivierung verändert wird. Die Glykokalyx enthält Proteoglykane, welche die Bindung an Matrixsubstanzen oder lösliche Agonisten, die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten und das Endothel sowie die Aggregation vermitteln (siehe 2.2).

Oberflächengebundenes Membransystem

Das oberflächengebundene Membransystem („Surface Connected System“, SCS) besteht aus verzweigten Kanälen, deren Membranoberflächen Eigenschaften des Plasmalemm aufweisen. So wurden auf den Oberflächen des SCS Membranrezeptoren wie der GP IIb/IIIa Rezeptor nachgewiesen (46). Beim Formwandel aktivierter Thrombozyten wird das als Membranreservoir dienende SCS evaginiert, wodurch die darin enthaltenen Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche zur Verfügung stehen. Auch wird dem SCS eine Rolle als Transportweg für Sekretionsprodukte aus den Speicherorganellen zugeschrieben (256).

Zellplasma und Zytoskelett

Das Grundplasma unstimulierter Thrombozyten weist Ansammlungen von Glykogenpartikeln und zirkulären Mikrotubuli auf, die zur Form der Zelle beitragen. Das submembranäre Zytoskelett (SMC) besteht aus kurzen Aktinfilamenten, die über Linkermoleküle an die Glykoproteine der Plasmamembran gebunden sind. Das SMC bildet zusammen mit den Mikrotubuli die Voraussetzung für die diskoidale Form der Thrombozyten und stabilisiert die Zellen gegen Scherkräfte. Auch verhindert das SMC die Fusion sekretorischer Organellen mit dem Plasmalemm und stellt somit eine Exozytosebarriere dar. Die Zellaktivierung führt zur Dissoziation der Membranrezeptoren vom SMC und zu

deren Destabilisierung. Durch die Destabilisierung des SMC können die Granula aus dem Zellinneren mit dem Plasmalemm verschmelzen und ihre Inhaltsstoffe an die Umgebung abgeben.

Das kontraktile Zytoskelett besteht aus zytoplasmatischen Aktin- und Myosinfilamenten, die aktivierungsabhängig ein kontraktiles Gel bilden, welches eine zentrale Zusammenlagerung der Zellorganellen mit Fusion zu sog. „Compoundgranula“ bewirkt und damit der Exozytose vorangeht. Daneben werden Liganden internalisiert, die über Rezeptoren oder Linkermoleküle an das Zytoskelett gebunden sind (183). Ein Beispiel für die Internalisierung fibrillärer Liganden ist die thrombin-induzierte Zellaggregation. Die Bindung von Fibrinogen an der Zelloberfläche führt zur Bildung von Ligandkomplexen mit dem GP IIb/IIIa Rezeptor. Diese Rezeptor-Ligandkomplexe sind über Linkerproteine mit dem kontraktilen Zytoskelett assoziiert und stellen das Substrat fokaler Kontakte dar (17). Bei der Fibrinpolymerisation entstehen Fibrinfasern, die aggregierte Thrombozyten voneinander separieren. Das kontraktile Zytoskelett internalisiert diese Fibrinfasern und führt so zu einer Retraktion des entstehenden Fibrinnetzes. Bei der Retraktion von Kollagenfasern werden ähnliche Retraktionen des Zytoskeletts beobachtet (258).

Zellorganellen

Die in den Thrombozyten lokalisierten Zellorganellen umfassen Mitochondrien, das dichte tubuläre System (DTS), α -Granula, elektronendichte Granula, Lysosomen und Peroxysomen. Die α -Granula weisen mit einem Anteil von 15% am Thrombozytenvolumen den größten Anteil aller Zellorganellen auf. Im ruhenden Thrombozyten liegen sie zentral vom Plasmalemm und dem SCS separiert. Die α -Granula sind Speicherorganellen für eine Vielzahl von Substanzen wie Fibrinogen, Thrombospondin (TSP), ADP, ATP, Thromboxan A_2 (TxA_2), β -Thromboglobulin (β -TG), Plättchenfaktor 4 (PF 4), plättchenaktivierender Faktor (PAF) und dem „Platelet-Derived Growth Factor“ (PDGF). Thrombozyten sind in der Lage, Substanzen wie Fibrinogen oder Albumin aus dem umgebenden Blutplasma aufzunehmen und in den Granula zu speichern. Daneben sind in den Granula membrangebundene Rezeptoren gespeichert, die aktivierungsabhängig freigesetzt werden (92, 255).

Die elektronendichten Granula oder Serotoningranula machen ca. 1% des Thrombozytenvolumens aus. Die relativ hohe Elektronendichte wird auf den Anteil von Kalzium- und Magnesiumionen sowie anorganischem Phosphat zurückgeführt. Sie enthalten hohe Konzentrationen an Serotonin, Kalzium, ADP und ATP. Im Gegensatz zu ATP und ADP wird Serotonin nicht in den Thrombozyten gebildet, sondern aus der Umgebung aufgenommen und in den Granula gespeichert. Freigesetztes Serotonin vermittelt eine lokale Vasokonstriktion und kann zelluläre Retraktionsmechanismen verstärken, während freigesetztes ADP die vor allem zelluläre Aktivierungsmechanismen verstärkt. Auch in den elektronendichten Granula finden sich membranständige Rezeptoren wie P-Selektin und GP IIb/IIIa.

Die Lysosomen stellen einen weiteren Organellentyp dar, der im Rahmen einer Zelldegranulation seine Inhaltsstoffe (v.a. saure Hydrolasen) an die Umgebung abgibt. Auch werden die in den Lysosomen gespeicherten Membranrezeptoren nach der Exozytose auf der Zelloberfläche exprimiert

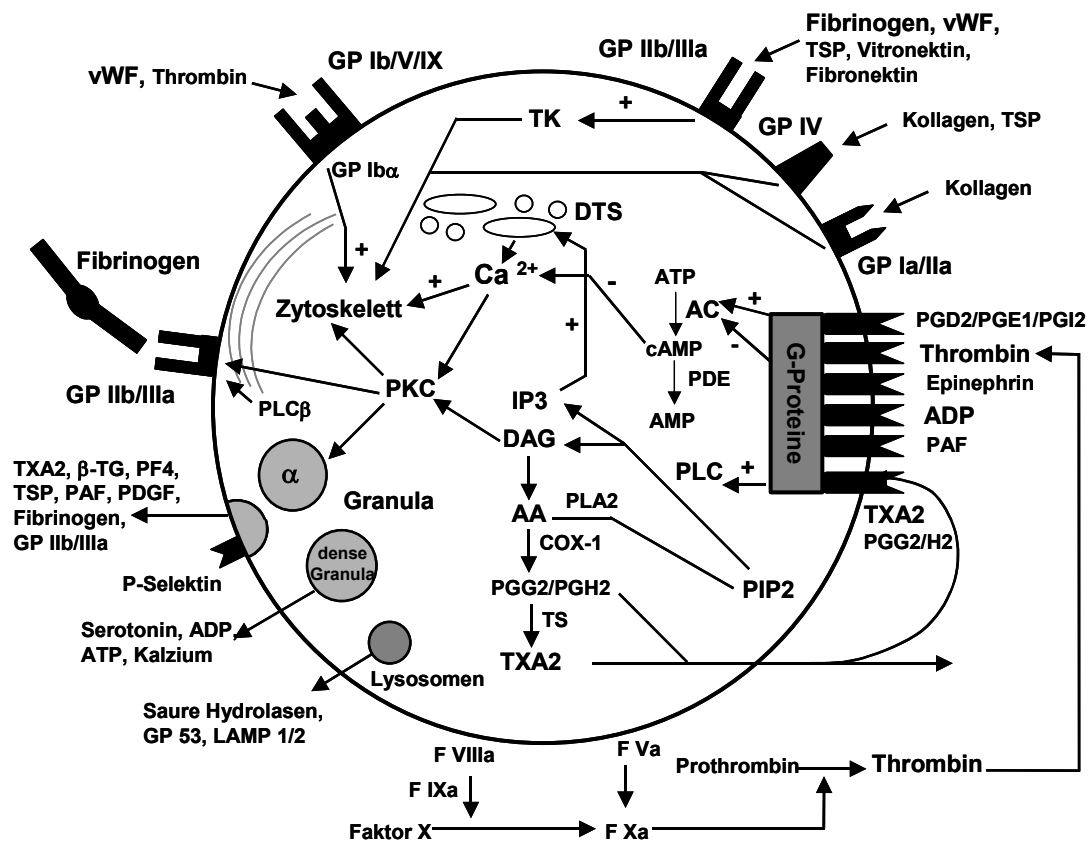
(siehe 2.2.7). Das DTS ist ein ubiquitär im Zytoplasma verteiltes abgeschlossenes Membransystem, in dessen Tubuli Lipide, bivalente Kationen, Proteine, Adenylatzyklasten, ATPasen und Peroxidasen nachgewiesen wurden, denen regulierende Funktionen bei der Zellaktivierung zugeschrieben werden (157).

2.1.2 Molekulare Mechanismen der Thrombozytenaggregation

Die Aktivierung und Aggregation zirkulierender Thrombozyten ist ein komplexer Vorgang und kann durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden. Zum einen kann die Zellaktivierung durch die Adhäsion der Thrombozyten an subendotheliale Matrixsubstanzen oder an Fremdoberflächen induziert werden. Hohe Scherkräfte des Blutes im Bereich von Gefäßstenosen können ebenfalls eine Zellaktivierung hervorrufen (124). Auch wirken lösliche Plasmaproteine wie das Thrombin über membrangebundene Zellrezeptoren direkt aktivierend auf zirkulierende Thrombozyten (siehe 2.2.9 und 2.2.10). Die Zellaktivierung wird im wesentlichen durch zwei intrazelluläre Stoffwechselwege vermittelt, die durch enzymatische Hydrolyse von Membranphospholipiden eingeleitet werden. Die Bindung der löslichen Agonisten Thrombin und ADP an entsprechende membranständige Rezeptoren führt zur Aktivierung einer Phospholipase C (PLC) und zur Hemmung einer Adenylatzyklase (AC). Die PLC spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu den als „second messenger“ dienenden Substanzen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerid (DAG). IP_3 führt zur Freisetzung von Kalzium aus dem DTS, während DAG und Kalzium eine Proteinkinase C (PKC) aktivieren, die ihrerseits die Phosphorylierung verschiedener Proteine katalysiert (43). Die G-Protein-gekoppelte AC katalysiert die Synthese von ATP zu cAMP. Hohe cAMP-Spiegel wirken einem Anstieg zytoplasmatischer Kalziumkonzentrationen und dadurch einer Zellaktivierung entgegen. Eine Hemmung der AC durch Rezeptorbindung von ADP wirkt der cAMP-Bildung entgegen, was zu einem Absinken der zytoplasmatischen cAMP-Konzentration führt. Im Gegensatz dazu steigern antiaggregatorisch wirkende Substanzen wie die Prostaglandine PGE_1 , PGD_2 und PGI_2 die cAMP-Spiegel durch Aktivierung der AC und Hemmung des cAMP-Abbaus über Phosphodiesterasen. Erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentrationen führen zur Aktivierung kalziumabhängiger Enzyme wie den Kontaktzonenkinasen an den Schnittstellen zwischen Zytoskelett und Membranrezeptoren. Die Aktivierung dieser Kontaktzonen führt über die Kontraktion von Aktin- und Myosinfibrillen zu dreidimensionalen Zytoskelettveränderungen. Erhöhte zytoplasmatische Kalziumkonzentrationen aktivieren eine Phospholipase A2 (PLA2) und führen zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA). Die freigesetzte AA wird über die Zykllooxygenase zu PGG_2 und PGH_2 und über die Thromboxansynthase zu TxA_2 umgewandelt. Das proaggregatorisch und vasokonstriktorisch wirkende TxA_2 wird aktivierungsabhängig zusammen mit Serotonin und ADP aus der Zelle freigesetzt (Abbildung 1) (43). Die intrazellulären Granula enthalten eine Vielzahl aggregationsfördernder Mediatoren wie ADP, TxA_2 , Serotonin, PAF, β -TG, PF 4 und dem PDGF, deren Freisetzung durch strukturelle Änderung

des kontraktiven Zytoskeletts und die PKC vermittelt wird. Die aus den Granula freigesetzten Agonisten verstärken durch Bindung an membranständige Rezeptoren die Zellaktivierung und induzieren eine Aktivierung weiterer Thrombozyten in der Umgebung der Zelle (175).

Abbildung 1: Zentrale Mechanismen der Thrombozytenaktivierung



Modifiziert nach Colman, R.W., et al. (43).

Abkürzungen: AA: Arachidonsäure, AC: Adenylatzyklase, ADP: Adenosindiphosphat, cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat, ATP: Adenosintriphosphat, β TG: Beta-Thromboglobulin, COX: Zyklusoxigenase, DAG: Diazylglyzerid, DTS: dichtes tubuläres System, GP: Glykoprotein, IP3: Inositol-1,4,5-triphosphat, PAF: Plättchenaktivierender Faktor, PDGF: Platelet-Derived Growth Factor, PDE: Phosphodiesterase, PG: Prostaglandin, PIP2: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat, PKC: Protein-kinase C, PLA / PLC: Phospholipase A/C, TK: Thrombokinas, TSP: Thrombospondin, TS: Thromboxansynthase, TXA: Thromboxan A, vWF: von Willebrand Faktor.

Während die Adhäsion der Thrombozyten und die intrazelluläre Zellaktivierung über unterschiedliche und teilweise komplexe Mechanismen verlaufen, wird die Aggregation fast ausschließlich über den aktivierten Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa) vermittelt. Der GP IIb/IIIa Rezeptor ist jedoch nicht nur Endpunkt der Aktivierungskaskade, sondern kann durch die Ligandenbindung auch zu einem Ausgangspunkt der Zellaktivierung werden (205). Verschiedene exzitatorische und inhibitorische Mechanismen führen zur Aktivierung oder zur Inaktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors. Die exakten Mechanismen der Signaltransduktion sind jedoch noch nicht eindeutig geklärt. Man vermutet, dass ein

Mechanismus, der die PKC, die PLC- β und ein heterotrimeres G-Protein beinhaltet, eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors über exzitatorische Membranrezeptoren spielt. Auch scheinen Tyrosinkinasen und eine Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) zur Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors beizutragen (Abbildung 1) (206).

2.2 Thrombozytenoberflächenrezeptoren

Die Adhäsion der Thrombozyten an das Gefäßendothel, subendotheliale Matrixsubstanzen und Leukozyten sowie die Aggregation aktivierter Zellen werden über unterschiedliche membran-gebundene Rezeptoren vermittelt. Die verschiedenen Reaktionsschritte, die zur Aktivierung und Aggregation der Thrombozyten führen, erfordern eine aktive Kommunikation der Zellen mit ihrer Umwelt. Als Informationsträger dienen dabei Adhäsionsproteine, Hormone, Autakoide und Enzyme, die mit spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche interagieren. Nach der Rezeptorbindung eines Liganden wird über die Aktivierung bestimmter „second messenger“ eine entsprechende Stoffwechselantwort hervorgerufen. Der Hauptanteil thrombozytärer Membranrezeptoren besteht aus Glykoproteinen, die entsprechend ihrer molekularen Strukturmerkmale den Integrinen, leuzinreichen Proteinen, Selektinen oder der Immunglobulin-Superfamilie zugeordnet werden (Tabelle 1).

Tabelle 1: Übersicht der membrangebundenen thrombozytären Glykoproteinrezeptoren

Glykoprotein	Struktur	Kopien/Zelle	Ligand(en)	Funktion
Integrine:				
VLA-2 (GP Ia/IIa)	$\alpha 2\beta 1$	ca. 2.000	Kollagen	Adhäsion
VLA-5 (GP Ic/IIa)	$\alpha 5\beta 1$	ca. 1.500	Fibronektin	Adhäsion
VLA-6 (GP Ic*/IIa)	$\alpha 6\beta 1$	ca. 1.500	Laminin	Adhäsion
Vitronektinrezeptor	$\alpha v\beta 3$	ca. 100	Vitronektin, Fibrinogen	Adhäsion / ?
GP IIb/IIIa	$\alpha 2b\beta 3$	40-80.000	Fibrinogen, vWF, TSP, Vitronektin, Fibronektin	Adhäsion / Aggregation
Leuzinreiche GP:				
GP Ib/V/IX	Ib α Ib β /V/IX	ca. 25.000	VWF	Adhäsion / Aktivierung
GP IV	sc	ca. 20.000	Kollagen, TSP	Adhäsion
Selektine:				
P-Selektin	sc	ca. 2.000	PSGL-1, Sialyl Lewis X	Leukozyten- / Endothel-Adhäsion
Weitere Rezeptoren:				
GP 53	sc	ca. 1.000	?	?
GP VI	sc	ca. 10.000	Kollagen	Adhäsion / Aktivierung
PECAM-1	sc	ca. 8.000	?	Zelladhäsion
ICAM-2	sc	ca. 5.000	LFA-1	Leukozyteninteraktion
LAMP-1 / -2	sc	ca. 1.000	?	?

VLA: Very Late Antigen; SC: Single Chain / Einzelkette; TSP: Thrombospondin; vWF: von Willebrand Faktor; PECAM: Platelet-endothelial Cell Adhesion Molecule; PSGL: P-Selectin Glycoprotein Ligand; ICAM: Intercellular Adhesion Molecule; LFA: Lymphocyte Function-associated Antigen; LAMP: Lysosomal-associated Membrane Protein.

2.2.1 Integrine

Die Integrine sind eine Gruppe heterodimerer Membranproteine, die jeweils aus einer α - und einer β -Untereinheit zusammengesetzt sind. Die Untereinheiten wiederum setzen sich aus einer großen extrazellulären Domäne, einem transmembranären Teil und einem kurzen zytoplasmatischen Ende zusammen. Integrine kommen in verschiedenen Zelltypen vor und spielen eine wichtige Rolle bei Zell-Zell-Interaktionen sowie Interaktion mit der extrazellulären Matrix. Als Liganden fungieren Adhäsivproteine wie der von Willebrand Faktor (vWF), Fibronectin, Vitronectin, Kollagen und verschiedene extrazelluläre Glykoproteine. Viele Integrine erkennen die in den Adhäsivproteinen enthaltene Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp (RGD). Auf der Thrombozytenoberfläche konnten insgesamt fünf verschiedene Integrine identifiziert werden, zu denen der Fibrinogenrezeptor (α_{IIb}/β_3), der Vitronectinrezeptor (α_v/β_3) und die unterschiedlichen VLA-Rezeptoren zählen (Tabelle 1) (86).

2.2.2 Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa)

Der GP IIb/IIIa Rezeptor ($\alpha_{IIb}\beta_3$) wird auf Thrombozyten, Megakaryozyten und auf einigen Tumorzellen exprimiert. Mit 50-80.000 Kopien pro Zelle und einem Anteil von 1,5% am Proteingehalt ist er quantitativ der wichtigste Thrombozytenrezeptor. Während er bei der Zelladhäsion funktionell eine eher untergeordnete Rolle spielt, wird die Aggregation fast ausschließlich über den GP IIb/IIIa Rezeptor vermittelt (205). Daneben tragen Interaktionen des Rezeptors mit Substanzen der extrazellulären Matrix zur Umwandlung des Zytoskeletts und damit zum Gestaltwandel der Zellen bei. Der GP IIb/IIIa Rezeptor ist primär auf der Zelloberfläche lokalisiert, jedoch befinden sich 20-30% der Rezeptoren im SCS und den Granula, die nach Zellaktivierung und Exozytose an die Oberfläche gelangen (46, 253).

Das heterodimere Integrin setzt sich aus einer 140 kD α -Untereinheit (α_{IIb}) und einer 105 kD β -Untereinheit (β_3) zusammen. Die IIb-Untereinheit besteht aus einer schweren (125 kD) und einer leichten (25 kD) Kette, die über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Die beiden Untereinheiten des GP IIb/IIIa Komplexes sind über Kalziumbrücken nicht-kovalent in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 miteinander verbunden (Abbildung 2) (181).

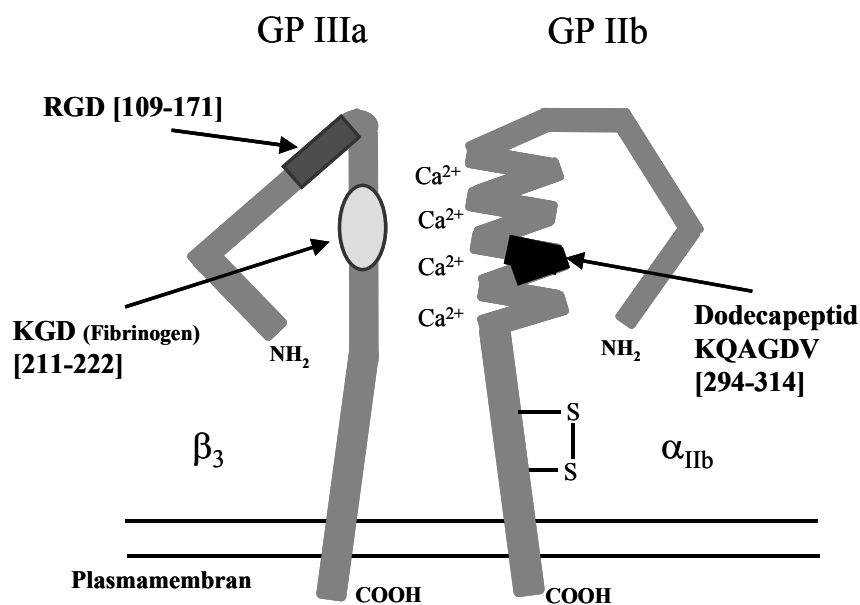
Aktivierung des GP IIb/IIIa Rezeptors und Ligandenbindung

Die Adhäsion an subendotheliale Matrixsubstanzen (Kollagen, vWF, Fibronectin) oder die Bindung löslicher Agonisten an die Thrombozytenoberfläche führen über intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen zur Zellaktivierung und zur Konformationsänderung des Fibrinogenrezeptors. Der nicht-aktivierte GP IIb/IIIa Rezeptor ist nicht in der Lage, lösliches Fibrinogen oder andere Adhäsivproteine zu binden. Erst durch die Konformationsänderung des Rezeptors werden die Bindungsstellen sterisch zugänglich, sodass er eine Bindung mit dem Liganden eingehen kann (59, 211). Das symmetrische

Peptiddimer Fibrinogen ist der wichtigste Ligand des GP IIb/IIIa Rezeptors, da über diesen die Bildung von Thrombozytenaggregaten über Fibrinogenbrücken erfolgt.

Zwei Hypothesen wurden entwickelt, die den Einfluss verschiedener Regulationsmechanismen auf den Aktivitätsstatus des GP IIb/IIIa Rezeptors beschreiben: Die „Affinitäts-Modulations“-Hypothese postuliert, dass direkte Interaktionen zwischen Regulationsproteinen und dem Rezeptor die Konformationsänderungen kontrollieren, die zur Bindung von Fibrinogen und vWF führen (133). Diese Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass exzitatorisch wirkende Agonisten die Bindung eines monovalenten Liganden-spezifischen Antikörperfragments an den Fibrinogenrezeptor stimulieren (1). Die „Aviditäts-Modulations“-Hypothese postuliert, dass die Konformationsänderung des Rezeptors und die Ligandenbindung durch die Freisetzung einer Subpopulation des Integrins aus der zytoskelettalen Umklammerung hervorgerufen wird. Diese einzwängende Wirkung des Zytoskeletts in ruhenden Thrombozyten hält den Rezeptor in der Form einzelner, räumlich voneinander getrennter Heterodimere, die sich bei Zellaktivierung zu Trauben von Oligomeren zusammenlagern (94).

Abbildung 2: Schematische Darstellung des GP IIb/IIIa Rezeptors



Modifiziert nach Phillips, D.R., et al. (181)

Verschiedene Bindungssequenzen auf dem Rezeptor wurden identifiziert, welche die Bindung mit Fibrinogen und dem vWF vermitteln. Die Bindungsstelle für die RGD-Peptidsequenz der Adhäsivproteine befindet sich auf der β₃-Kette des Rezeptors (Abbildung 2). Die Bindung des Fibrinogenmoleküls an den Rezeptor wird durch mindestens zwei Peptidsequenzen vermittelt: Neben der RGD-Sequenz der α_{IIb}-Kette stellt das am Carboxylende der γ-Kette des Fibrinogenmoleküls lokalisierte

Dodecapeptid mit der AS-Sequenz HHLGGAKQAGDV eine wichtige Bindungssequenz dar (66, 184). Die Bindungsstelle dieser, nur im Fibrinogenmolekül enthaltene Peptidsequenz befindet sich auf der α_{Ib} -Kette des Rezeptors (Abbildung 2). Immunologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen der Interaktionen zwischen Rezeptor und Ligand legen die Vermutung nahe, dass vor allem die γ -Kette des Fibrinogenmoleküls an der Bindung beteiligt ist (14, 252). Die Interaktionen zwischen den beiden Bindungssequenzen der γ -Kette und der $A\alpha$ -Kette des Fibrinogenmoleküls mit dem Rezeptor sind im einzelnen jedoch noch nicht genau verstanden. Vermutlich ist ein Zusammenspiel beider Fibrinogenbindungssequenzen für die Rezeptorbindung erforderlich. Auch konnte eine dritte Bindungsstelle auf der β_3 -Kette des Rezeptors identifiziert werden, die Angriffspunkt für Peptide mit einer Lys-Gly-Asp-Aminosäuresequenz (KGD) ist, welche die Fibrinogenbindung an die Zelle und damit die Aggregation hemmen (196).

Neben den intrazellulären Aktivierungsmechanismen, die zur Konformationsänderung der quartären Rezeptorstruktur beitragen, führt auch die Ligandenbindung an den GP IIb/IIIa Rezeptor selbst zu einer Konformationsänderung mit der Ausbildung von Neopepitopen, den sogenannten „Ligand-induced Binding Sites“ (LIBS) (72, 208). Die komplexe bivalente Form bleibt auch im aktivierten Zustand erhalten. Während der nicht-aktivierte GP IIb/IIIa Rezeptor fast nur an immobilisiertes Fibrinogen bindet, besitzt der aktivierte Rezeptor die Fähigkeit auch lösliches Fibrinogen zu binden. Auch steigt die Bindungsaffinität für Fibrinogen durch die Konformationsänderung des Rezeptors um ein Vielfaches an (205). Durch die Ligandenbindung treten die zytoplasmatischen Bestandteile des GP IIb/IIIa Rezeptors in Kontakt mit Komponenten des Zytoskeletts, was zu einer Reorganisationen des Zytoskeletts und einer Gruppierung der Fibrinogenrezeptoren auf der Zelloberfläche beiträgt. Die Fibrinogenbindung in diesem, als „Outside-in Signaling“ bezeichneten Prozessen stimuliert die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Thrombozytenproteine sowie die Aktivierung spezifischer Tyrosinkinasen. Der Prozess der Zellaktivierung führt zu Interaktionen aktivierter Tyrosinkinasen mit dem Zytoskelett, wodurch Gestaltänderungen in der Zelle hervorgerufen werden (48, 206).

2.2.3 Vitronektinrezeptor

Der Vitronektinrezeptor ($\alpha_v\beta_3$) wird im Vergleich zum GP IIb/IIIa Rezeptor nur in geringer Zahl auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert. Die α -Untereinheit weist eine nur 30%ige Sequenzhomologie mit der α_{Ib} -Untereinheit des GP IIb/IIIa Rezeptors auf, während die β -Ketten strukturell gleich aufgebaut sind. Der Vitronektinrezeptor fungiert als Rezeptor für Adhäsivproteine mit der RGD-Bindungssequenz. Die physiologische Bedeutung des thrombozytären Vitronektinrezeptors ist bisher unklar, während der auf Endothelzellen exprimierte Vitronektinrezeptor u.a. zur Adhäsion und Migration von Neutrophilen und Monozyten durch das Endothel ins perivaskuläre Gewebe beiträgt (68, 205).

2.2.4 VLA-Rezeptoren

Die thrombozytären VLA-Rezeptoren („Very Late Antigen“) VLA-2, -5, und -6 enthalten als gemeinsames Merkmal eine β_1 -Untereinheit (Tabelle 1). Das ursprünglich als GP Ia-IIa bezeichnete VLA-2 ($\alpha_2\beta_1$) fungiert als Kollagenrezeptor auf der Zelloberfläche und geht, in Anwesenheit von Magnesiumionen, eine Bindung mit verschiedenen Kollagentypen ein (213). Die Kollagenbindung wird durch Interaktionen mit dem GP VI gefördert. Neuere Untersuchungen legen die Vermutung nahe, dass die Zellaktivierung durch die Adhäsion an Kollagen nicht primär über VLA-2, sondern über das GP VI vermittelt wird (3, 249).

Das VLA-5 ($\alpha_5\beta_1$) vermittelt die Bindung an Fibronectin. Nicht aktivierte Thrombozyten sind in der Lage, an oberflächengebundenes Fibronectin zu binden und können sich auf dieser Proteinschicht ausbreiten. Auch der GP IIb/IIIa Rezeptor kann als Rezeptor für Fibronectin fungieren. Die Interaktion der beiden Rezeptoren mit dem Fibronectin hängt dabei von der Strömungsgeschwindigkeit der zirkulierenden Thrombozyten ab (20). Das VLA-6 ($\alpha_6\beta_1$) schließlich vermittelt die Zelladhäsion an das Matrixprotein Laminin unter statischen wie auch unter Strömungsbedingungen (212).

2.2.5 Glykoprotein Ib-V-IX Rezeptorkomplex

Der aus den Glykoproteinen Ib, V und IX gebildete nicht-kovalente Rezeptorkomplex ist mit ca. 25.000 Kopien auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten exprimiert (153). Im Gegensatz zu anderen Membranrezeptoren führt die Zellaktivierung zu einer reversiblen Internalisierung des Rezeptorkomplexes in das OCS (149, 150). Der GP Ib Rezeptor (160 kD) besteht aus den Untereinheiten $Ib\alpha$ und $Ib\beta$, die über Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden sind. Die Rezeptoren GP Ib und GP IX (22 kD) sind transmembranäre Glykoproteine, die innerhalb ihrer extrazellulären Abschnitte leuzinreiche Abschnitte enthalten (39). Der GP Ib-V-IX Komplex ist der primäre und wichtigste Rezeptor für den vWF. Nach Gefäßwandverletzungen bindet der im Plasma zirkulierende vWF an Kollagenmoleküle der extrazellulären Matrix, wodurch Konformationsänderungen induziert und die bis dahin verdeckt liegenden Bindungsstellen des vWF für den GP Ib Rezeptor zugänglich werden. Als eine Bindungsstelle des vWF wurde die N-terminale Domäne (His1-Glu282) der $GPIb\alpha$ -Kette identifiziert. Jedoch scheinen auch andere Domänen der $GPIb\alpha$ -Kette an der vWF-Bindung beteiligt zu sein (249). Die zytoplasmatische Domäne der $GPIb\alpha$ -Kette ist mit aktin-bindenden Proteinen des Zytoskeletts verbunden, wodurch strukturelle Veränderungen der Zelle nach Ligandenbindung vermittelt werden (47). Die Bindung zwischen GP Ib und vWF scheint insbesondere bei hohen Strömungsgeschwindigkeiten und hohen Scherkräften von Bedeutung zu sein (124). Eine Voraussetzung für die hochaffine Bindung an den Rezeptor ist eine Multimerisation des vWF-Moleküls, da nur eine Vielzahl von Bindungen mit GP Ib im vWF Multimer stabile Interaktionen mit dem

Thrombozyten gewährleisten kann. Da im Plasma zirkulierender vWF nicht an den GP Ib Rezeptor bindet, wird eine intravasale Thrombozytenadhäsion verhindert (4).

Das leuzinreiche Glykoprotein V (82 kD) ist nicht-kovalent mit den anderen beiden Untereinheiten des Rezeptorkomplexes assoziiert (99). Durch direkte Interaktion mit GP Ib und IX übt GP V eine regulierende Funktion auf den Rezeptorkomplex aus und verstärkt die vWF-Bindung (146).

Nicht nur der vWF sondern auch das α -Thrombin bindet an eine extrazelluläre Domäne der GP Ib-Kette (140). Thrombin spaltet das GP V in ein lösliches Fragment und einen membranständigen Anteil. Jedoch korreliert die Hydrolyserate des GP V nicht mit der Zellaktivierung und -aggregation nach Thrombinstimulation (108). Es wird vermutet, dass GP V unabhängig von der Thrombinspaltung an der Bildung eines hochaffinen Thrombinrezeptors auf der Zelloberfläche beteiligt ist (58).

2.2.6 P-Selektin

Die Mitglieder Familie der Selektine weisen eine charakteristische Molekülstruktur mit einer lektin-ähnlichen Domäne im extrazellulären N-terminalen Bereich auf, gefolgt von einer dem Epidermal Growth Factor (EGF) ähnelnden Domäne. Das integrale membrangebundene P-Selektin (GMP 140 / CD 62P) ist in den α -Granula und elektronendichten Granula der Thrombozyten sowie in den Weibel-Palade Körperchen von Endothelzellen gespeichert (141). Auf der Oberfläche ruhender Thrombozyten wird P-Selektin nur in geringer Anzahl exprimiert, während sich der Hauptanteil dieses Membranproteins in den α -Granula befindet. Wenige Sekunden nach der Zellaktivierung geben diese ihren Inhalt in das OCS ab, gefolgt von der Expression des gespeicherten P-Selektin auf der Zelloberfläche (104). Ein Teil des freigesetzten P-Selektins wird in löslicher Form an die Umgebung abgegeben. Auf der Oberfläche aktivierter Zellen werden bis zu 5.000 Rezeptoren nachgewiesen. Das auf der Zelloberfläche freigesetzte P-Selektin trägt zur Adhäsion der Thrombozyten mit Neutrophilen und Monozyten über die Bindung mit dem, dort exprimierten P-Selectin Glycoprotein Ligand (PSGL-1) bei (77). Die rasche, aktivierungsabhängige Rezeptorexpression macht P-Selektin zu einem geeigneten Marker, um den Aktivierungsgrad zirkulierender Thrombozyten zu quantifizieren (144, 147).

2.2.7 Glykoprotein 53 und Lysosomen-assoziierte Membranproteine

Das membranständige 53 kD Glykoprotein 53 (CD 63) ist hauptsächlich in den elektronendichten Granula und den Lysosomen der Thrombozyten lokalisiert (143). Ähnlich dem P-Selektin wird GP 53 über eine aktivierungsabhängige Degranulation auf der Zelloberfläche exprimiert (145, 171). Die Freisetzung erfolgt über die Abgabe der Granulainhaltsstoffe in das OCS und von dort auf die Zelloberfläche (69, 88). Die Lysosomen-assoziierten Membranproteine LAMP-1 (CD 107a) und LAMP-2 (CD 107b) sind ebenfalls in den lysosomalen Granula und den dichten Granula lokalisiert und werden aktivierungsabhängig der Zelloberfläche exprimiert (67, 107). Die Funktionen des GP 53 und der

LAMP-1 /-2 sind bisher unklar. Man vermutet, dass sie eine Rolle beim Schutz der Plasmamembran vor Hydrolyse spielen (76). Die aktivierungsabhängige Expression dieser Membranproteine machen sie zu weiteren geeigneten Marker für eine Charakterisierung der Zellaktivierung.

2.2.8 Glykoprotein IV und Glykoprotein VI

Das Glykoprotein IV ist ein stark glykolisiertes 90 kD Membranprotein, das durch Bindung von Kollagen und Thrombospondin am Prozess der Zelladhäsion beteiligt ist (57, 222). Entgegen früherer Beobachtungen, die GP IV als einen zentralen Rezeptor für die Kollagenbindung ansahen (221), scheint GP IV jedoch nur eine untergeordnete Rolle bei der durch Kollagenbindung induzierten Zellaktivierung zu spielen (163). Die Kollagenbindung an GP VI scheint für die Zellfunktion wichtiger zu sein, da über dieses Membranprotein Signaltransduktionsmechanismen vermittelt werden, die zur Zellaktivierung führen (117). Eine wichtige Rolle spielen hierbei die membranständige FcR γ -Kette des GP VI und die Tyrosinkinase Syk, welche die Phosphorylierung der PLC-2 vermittelt (182). Eine verminderte Expression des GP VI Rezeptors ist mit einer leicht eingeschränkten Thrombozytenadhäsion und -aggregation sowie einer leicht erhöhten Blutungsneigung assoziiert (6).

2.2.9 Thrombinrezeptor

Thrombinrezeptoren wurden auf Thrombozyten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen nachgewiesen, wo sie als Zellaktivatoren fungieren. Auf Thrombozyten stellt der Thrombinrezeptor einen der wichtigsten Mediatoren der physiologischen Zellaktivierung dar (132). Der aus 7 transmembranären Domänen bestehende Rezeptor ist intrazellulär an G-Proteine gekoppelt, während die extrazelluläre Domäne das Substrat für die Thrombinbindung darstellt (12, 53). In ruhenden Thrombozyten finden sich nur etwa 2/3 der Thrombinrezeptoren auf der Plasmamembran. Durch Aktivierung der Zellen mit ADP oder Thromboxan gelangen die in dem SCS befindlichen Rezeptoren an die Oberfläche, wo sie für die Thrombinbindung bereitstehen (154). Die Thrombinbindung an den Rezeptor, der auch als Protease Activated Receptor (PAR) bezeichnet wird, führt zur Abspaltung eines 41 AS-Peptids am aminoterminalen Abschnitt des Rezeptors. Das freigelegte aminotermine Rezeptorende mit der AS-Sequenz SFLLRNPNDKYEPF, das auch als Thrombin Receptor Activating Peptide (TRAP) bezeichnet wird, bindet intramolekular an die Residuen 42-55 des zentralen Rezeptorabschnitts und induziert so wodurch eine Aktivierung des G-Protein gekoppelten Rezeptors (24, 45). Auch ein vom Thrombinrezeptor abgespaltenes 41 AS-Peptid wurde als Zellaktivator beschrieben (78). Bisher konnten vier PARs identifiziert werden, von denen zwei auf der Thrombozytenoberfläche lokalisiert sind (113).

2.2.10 ADP-Rezeptoren

Obwohl ADP selbst nur ein relativ schwacher Agonist ist, zählt es zu den wichtigsten physiologischen Thrombozytenaktivatoren, da es als Kofaktor die Wirkung verschiedener Agonisten verstärkt. Die Hemmung einer Adenylatzyklase und der Einstrom von Kalziumionen in die Zelle sind zwei zentrale Mechanismen, die über ADP-Rezeptoren vermittelt werden (79). Die aus Thrombozytengranula, Erythrozyten oder Endothelzellen freigesetzten Adeninnukleotide interagieren mit den auf unterschiedlichen Zelltypen exprimierten membranständigen P2-Purinrezeptoren. Die P2-Purinrezeptoren werden in zwei Gruppen unterteilt: die G-Protein gekoppelten P2Y-Rezeptoren und die mit Ionenkanälen assoziierten P2X-Rezeptoren. Bisher wurden 11 verschiedene P2X-Rezeptoren und 7 P2Y-Rezeptoren identifiziert. Eine Reihe von P2Y-Rezeptoren konnte aus humanen Erythrozyten und Endothelzellen geklont werden (34).

Mindestens drei unterschiedliche ADP-Rezeptoren sind am Prozess der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation beteiligt (49). Der an einen Kalziumionenkanal gekoppelte P2X₁-Rezeptor vermittelt einen schnellen Kalziumeinstrom in die Zelle (135), scheint jedoch eine eher untergeordnete Rolle bei der ADP-induzierten Aggregation zu spielen (218). Die Zellantwort auf ADP wird hauptsächlich durch die G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren vermittelt. Hierbei initiiert der an eine PLC gekoppelte P2Y₁-Rezeptor (P2T_{PLC}) den ADP-induzierten Formwandel, die intrazelluläre Kalziummobilisation und die Aggregation (97, 111). Die Aktivierung des P2Y₁-Rezeptors führt zu einer schnellen transienten Aggregation, ist jedoch nicht ausreichend eine vollständige aggregatorische Antwort zu vermitteln (110, 193). Die ADP-Bindung an den zweiten G-Protein-gekoppelten Purinrezeptor P2Y_{AC} führt zu einer Hemmung einer membranständigen Adenylatzyklase. Hierdurch wird vor allem eine Verstärkung der aggregatorischen Antwort auf ADP hervorgerufen. Erst kürzlich konnte dieser Gi-gekoppelte ADP-Rezeptor (P2T_{AC} / P2Y₁₂) charakterisiert und geklont werden (71, 101). Die volle aggregatorische Antwort der Zelle auf ADP erfordert jedoch eine gemeinsame Aktivierung beider G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptoren (112).

2.3 Thrombozyten und plasmatische Gerinnung

Zentrale Mechanismen der plasmatischen Gerinnung sind die Bildung der Serinprotease Thrombin aus Prothrombin und die Überführung von löslichem Fibrinogen in ein quervernetztes Fibringerinnsel. Ein wichtiger Mechanismus der plasmatischen Gerinnungskaskade ist die Aktivierung von enzymatisch nicht aktiven Proenzymen. Interaktionen zwischen Thrombozyten und der plasmatischen Gerinnungskaskade finden sich bei der Bildung des Tenasekomplexes und des Prothrombokinasekomplexes. Der aus den Gerinnungsfaktoren IXa, VIIIa und Kalzium zusammengesetzte Tenasekomplex katalysiert die Bildung von F Xa aus dem Proenzym F X. Der als Kofaktor fungierende F VIII beschleunigt die Bildung von F Xa um ein Vielfaches. Voraussetzung hierfür sind Kalziumionen und Phospholipidbindungsstellen, die auf aktivierten Thrombozyten und Endothelzellen exprimiert werden (164). Der

Kofaktor V, der als aktivierter F Va zusammen mit F Xa und Kalziumionen den Prothrombinasekomplex bildet, wird in Thrombozyten gespeichert und aktivierungsabhängig als partiell proteolyisiertes und an thrombozytäre Mikropartikel gebundenes Molekül freigesetzt (156). Durch eine Komplexbildung von F Va und F Xa an die negativ geladenen Oberflächenmembranen aktivierter Thrombozyten steigt die Prothrombinaktivierung auf ein Vielfaches an (Abbildung 1). Thrombin wirkt durch einen über Thrombinrezeptoren vermittelten positiven Rückkopplungsmechanismus wiederum aktivierend auf zirkulierende Thrombozyten (156, 174).

In den Thrombozytengranula werden unter anderem der Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) und der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI) gespeichert, die regulierend auf das plasmatische Gerinnungssystem sowie die intravasale Fibrinolyseaktivität wirken. Der wichtigste Inhibitor der Plasminogenaktivatoren PAI-1 wird primär in Endothelzellen, jedoch zu einem geringen Teil auch in Megakaryozyten gebildet. PAI-1 ist teilweise in Thrombozyten gespeichert und wird aktivierungsabhängig sezerniert. Während erniedrigte PAI-1-Spiegel mit einer gesteigerten fibrinolytischen Aktivität und einer Blutungsneigung einhergehen, scheinen erhöhte PAI-1-Spiegel bzw. eine verstärkte PAI-1-Aktivität im Sinne einer Hypofibrinolyse das Auftreten thrombotische Ereignisse zu begünstigen (90, 169). TFPI hemmt den extrinsischen Weg der Gerinnungskaskade über eine Komplexbildung mit TF und F VIIa sowie eine direkte Hemmung von F Xa. Dem TFPI wird eine modulierende Rolle bei der Bildung arterieller Thromben nach Gefäßtraumatisierungen zugeschrieben, die von einer verstärkten lokalen TF-Freisetzung begleitet sind (186). Bei Patienten mit akuter Myokardischämie wurden neben erhöhten Plasmakonzentrationen des TF auch erhöhte TFPI-Konzentrationen gemessen (65, 114).

2.4 Thrombozyten und Atherosklerose

Die Atherosklerose wird definiert als eine variable Kombination von Veränderungen der Gefäßintima, bestehend aus herdförmigen Ansammlungen von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Gefäßmedia. Ursächlich hierfür sind länger andauernde metabolische, entzündliche und physikalische Gefäßwandschäden, die später in einen sklerosierenden Gefäßwandumbau übergehen (187). Zu den kausalpathogenetisch wichtigsten Faktoren der Atheroskleroseentstehung zählen die alimentäre Hyperlipoproteinämie, die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus und der Nikotinkonsum, jedoch auch angeborene Fettstoffwechselstörungen oder die Homozysteinurie. In der Folge kommt es zu Einlagerungen von Lipiden und Schaumzellen in die Gefäßwand und schließlich zur Ausbildung eines Atheroms an Prädispositionsstellen im arteriellen Gefäßsystem (214). Insbesondere Stellen im Gefäßbaum, wo die Blutströmung ihre Richtung ändert und Turbulenzen des vorbeiströmenden Blutes auftreten, sind für die Atherombildung prädisponiert.

Akute thrombotische Gefäßverschlüsse stellen eine Hauptkomplikation der koronaren Atherosklerose dar, die sich klinisch als akute Myokardischämie manifestieren. Ursache eines akuten Gefäßverschlusses ist häufig eine spontane Ruptur einer lipidreichen Plaque mit der Freisetzung von thrombogen wirkenden Inhaltsstoffen (10, 50). Auch bilden sich im Bereich einer rupturierten Plaque Zonen mit hohen Scherkräften des zirkulierenden Blutes, die zur Aktivierung vorbeifließender Thrombozyten beitragen (191). Die als physiologische Reaktion auf eine lokale Gefäßwandverletzung stattfindende Thrombozytenaktivierung erfährt im atherosklerotisch veränderten Gefäßsystem eine pathologische Komponente, da hier ein lokales Ungleichgewicht zwischen pro- und antikoagulatorischen Mechanismen entsteht. Zum einen stellt das Trauma einer Plaqueruptur einen starken lokalen prothrombogenen Reiz dar. Dem gegenüber werden durch Schäden oder eine Dysfunktion des Endothels antikoagulatorisch wirkende Substanzen wie Thrombomodulin oder NO nur eingeschränkt synthetisiert und sezerniert. Dieses Ungleichgewicht von pro- und antikoagulatorisch wirkenden Faktoren trägt zur Ausbildung eines okkludierenden intraluminalen Thrombus bei. Dabei vermitteln aktivierte Thrombozyten nicht nur die Thrombusbildung, sondern tragen durch die Abgabe vasoaktiver Inhaltsstoffe auch zur lokalen Vasokonstriktion bei (40).

2.5 Thrombozytenfunktion und Koronarintervention

Die perkutane transluminale Koronarangioplastie (PTCA) und die Implantation von Stents haben sich zu einem wichtigen Therapiekonzept bei der Behandlung der koronaren Herzerkrankung entwickelt. Lange Zeit stellte die Ausbildung akuter und subakuter Gefäßverschlüsse jedoch eine wesentliche Limitation der Koronarinterventionen dar. Ursachen akuter Gefäßverschlüsse liegen v.a. in einer Traumatisierung der Gefäßwand durch die Ballondilatation mit einer reaktiven Thrombozytenaktivierung. Durch die Ballondilatation wird ein lokales Barotrauma induziert, das zur Denudierung des Gefäßendothels und dem Aufbrechen der Koronarstenose mit Einrissen bis in die Gefäßadventitia führt. Insbesondere tiefe Gefäßtraumatisierungen durch Ballonkatheter führen zur Exposition stark thrombogen wirkender Matrixsubstanzen sowie zur Ausbildung flusslimitierender Gefäßwanddissektionen (247). Hierdurch wird eine starke lokale Aktivierung vorbeifließender Thrombozyten induziert (256). Die Zelladhäsion stellt den Ausgangspunkt der Thrombozytenaktivierung dar, die über Formwandel, Degranulation und Aggregation zur Thrombusbildung führt. Autopsische Untersuchungen von Patienten mit akuten postinterventionellen Gefäßverschlüssen zeigten, dass die okklusiven intraluminalen Thromben zu einem Großteil aus Thrombozyten und Fibrin bestanden (248). In klinischen Untersuchungen konnte eine vermehrte Aktivierung und erhöhte Aggregationsneigung zirkulierender Thrombozyten im Rahmen von Koronarinterventionen beobachtet werden (81, 123, 197). Die Implantation von Stents hat in den letzten Jahren gegenüber der alleinigen Ballonangioplastie wesentlich an Bedeutung gewonnen. Während Stents zunächst primär bei der Behandlung von Gefäßdissektionen eingesetzt wurden (96), werden sie mittlerweile erfolgreich als

primäres Verfahren für die Behandlung von De-novo Stenosen oder Restenosen eingesetzt (62, 203). Die Ausbildung thrombotischer Verschlüsse nach Stentimplantation galt lange Zeit als eine entscheidende Limitation dieser Interventionstechnik (95). Insbesondere der durch die metallische Oberfläche der Stents hervorgerufene thrombogene Reiz birgt das Risiko eines akuten Gefäßverschlusses (87). So wurde in klinischen Untersuchungen eine verstärkte Aktivierung zirkulierender Thrombozyten nach koronarer Stentimplantation beobachtet (81). Durch den Einsatz einer kombinierten antiaggregatorischen Therapie mit ASS und Thienopyridinen sowie spezifischen Thrombozytenrezeptorantagonisten konnte das Risiko thrombotisch bedingter Komplikationen nach PTCA und Stentimplantation in den letzten Jahren wesentlich reduziert werden (siehe 2.7.2 und 2.7.3).

2.6 Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen

Neben der vermehrten Aktivierung zirkulierender Thrombozyten spielen Entzündungsreaktionen eine wichtige Rolle in der Pathogenese akuter thrombotischer Ereignisse. So wird bei Patienten mit akuter Myokardischämie, die mittels Ballonangioplastie oder systemischer Fibrinolyse behandelt werden, neben einer verstärkten Thrombozytenaktivierung auch eine vermehrte Aktivierung zirkulierender Leukozyten beobachtet. Diese ist von einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine begleitet (131, 166, 167). Auch werden von aktivierten Neutrophilen Sauerstoffradikale freigesetzt, die Zellschäden in der Mikrovaskulatur verursachen und so zur Ausbildung von Reperfusionsschäden nach Wiedereröffnung verschlossener Koronargefäße beitragen (61, 126). Systemische Entzündungsreaktionen im Rahmen akuter Myokardischämien sind vor allem von einer verstärkten Aktivierung Neutrophiler und Monozyten begleitet, während eine Aktivierung zirkulierender Lymphozyten kaum stattfindet (219). Klinische und experimentelle Untersuchungen konnten zeigen, dass zirkulierende Leukozyten durch die Adhäsion von Thrombozyten aktiviert sowie zur Bildung und Freisetzung von Zytokinen angeregt werden. So wurden bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom neben einer verstärkten Aktivierung zirkulierender Leukozyten auch vermehrt Interaktionen zwischen Thrombozyten und Neutrophilen beobachtet (176). In vitro induziert die Thrombozytenadhäsion an Monozyten und Neutrophile (PMN) eine vermehrte Synthese der Zytokine Interleukin 1 β und 8 sowie des Monocyte Chemoattractant Proteins (MCP-1) (165, 254). Die vermehrte Zytokinsynthese und -sekretion wie auch die Freisetzung von Sauerstoffradikalen aus Leukozyten wird dabei unter anderem durch das thrombozytäre P-Selektin vermittelt (162). Daneben tragen abgespaltene Mikropartikel aktivierter Thrombozyten zur Adhäsion an Leukozyten und deren Aktivierung bei (70).

Aktivierter Thrombozyten spielen eine wichtige Rolle bei der Akkumulation zirkulierender Leukozyten in einen intraluminalen Thrombus nach einer Gefäßverletzung sowie der Migration von Leukozyten durch die Gefäßwand ins perivaskuläre Gewebe (56, 120). Dabei binden die Thrombozyten primär an Monozyten und PMN, während eine Adhäsion an Lymphozyten kaum stattfindet (190).

Die Akkumulation von Monozyten und PMN in einen Thrombus scheint unter anderem durch das thrombozytäre P-Selektin vermittelt zu sein, da die Leukozytenakkumulation und die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an Monozyten und PMN durch einen Antikörper gegen P-Selektin gehemmt werden kann (177, 189). Auch trägt P-Selektin zur Adhäsion von PMN an das Endothel und damit zur Migration in das perivaskuläre Gewebe im Rahmen myokardialer Reperfusion bei (122).

Die Zelladhäsion von Thrombozyten an Leukozyten erfolgt primär über das thrombozytäre P-Selektin sowie dem auf Leukozyten exprimierten PSGL-1 (36, 142, 177). Auch der membranständige Thrombospondinrezeptor scheint am Adhäsionsprozess beteiligt zu sein (209). Die Bindung zwischen Thrombozyten und PMN läuft in einer kaskadenartigen Reaktion ab, die durch ein über P-Selektin vermitteltes „Rollen“ der Thrombozyten an PMN eingeleitet wird und zu einer über β_2 -Integrine vermittelten festen Adhäsion zwischen den Zellen führt (26, 63). P-Selektin scheint über den PSGL-1 einen direkten Einfluss auf die Funktion leukozytärer β_2 -Integrine auszuüben (21). Durch die Bindung von P-Selektin an PSGL-1 wird die Phosphorylierung von Tyrosinkinasen und die Aktivierung von Mitogen-activated Protein (MAP) Kinasen in den PMN induziert (100). Die über PSGL-1 induzierte Tyrosin-Phosphorylierung scheint ihrerseits die Adhäsion der PMN über das β_2 -Integrin Mac-1 (CD 11b/18) zu triggern (64). Auch die Adhäsion zirkulierender PMN an das Endothel wird über leukozytäre β_2 -Integrine und endotheliale Selektine vermittelt. Eine indirekte Rolle bei der Leukozytenadhäsion wird dem thrombozytären GP IIb/IIIa Rezeptor zugeschrieben. Während Thrombozytenrollen an Leukozyten durch P-Selektin und PSGL-1 vermittelt wird, scheint die Bindung zwischen GP IIb/IIIa und Mac-1 über Fibrinogenbrücken zur festen Adhäsion von Thrombozyten an PMN unter Strömungsbedingungen beizutragen (251). In einer klinischen Studie wurde beobachtet, dass bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom unter einer Therapie mit einem GP IIb/IIIa Antagonisten nicht nur die Thrombozytenaggregation und Fibrinogenbindung, sondern auch die Adhäsion von Thrombozyten an PMN vermindert war (257).

Neben der Thrombozytenadhäsion tragen verschiedene inflammatorische Stimuli zur Aktivierung von Leukozyten bei. Die Aktivierungsmechanismen im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen führen unter anderem zur Freisetzung von Cathepsin G. Die Protease Cathepsin G ist ein starker Thrombozytenagonist und bewirkt in Konzentrationen, wie sie in aktivierten PMN gefunden werden, eine Thrombozytenaktivierung mit vermehrter Thromboxanbildung, Degranulation und Aggregation (35, 201). Angriffspunkte des Cathepsin G scheinen die Rezeptoren GP Ib und GP IIb/IIIa zu sein (155). Durch die Freisetzung von Cathepsin G tragen aktivierte Leukozyten zur Thrombozytenaktivierung bei und führen hierüber zur Anlagerung von Thrombozyten an die Stelle einer Gefäßverletzung.

2.7 Thrombozytenaggregationshemmer

In den letzten Jahren haben Thrombozytenaggregationshemmer einen immer größeren Stellenwert in der Therapie von Patienten mit symptomatischer Atherosklerose eingenommen. Neben der Acetylsalicylsäure als klassischem Vertreter der Thrombozytenaggregationshemmer werden Thienopyridine erfolgreich in der Sekundärprophylaxe thrombembolisch bedingter ischämischer Ereignisse eingesetzt. Durch den Einsatz von Thienopyridinen und GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten konnten wesentliche Verbesserungen in der Behandlung des akuten Koronarsyndroms und in der Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse nach Koronarinterventionen erzielt werden.

2.7.1 Acetylsalicylsäure

Die aggregationshemmenden Eigenschaften der oral verfügbaren Acetylsalicylsäure (ASS), die erst 70 Jahre nach deren Einführung als antiphlogistisches und antipyretisches Analgetikum entdeckt wurden, machten es zum Standardpräparat für die Sekundärprophylaxe akuter Myokardischämien. Die aggregationshemmenden Eigenschaften von ASS beruhen auf der irreversiblen Hemmung des Zykllooxygenasezentrums der PGH-Synthetase durch Acetylierung eines spezifischen Serinanteils, wodurch die Synthese von PGH₂ und damit die Bildung von TxA₂ in den Thrombozyten gehemmt werden. ASS hemmt v.a. die Aktivität der Zyklooxygenase Isoform COX-1, die hauptsächlich an der Regulation der Thrombozytenaktivierung beteiligt ist (8). Die Hemmung der Zyklooxygenase führt jedoch auch zur Hemmung des aggregationshemmend und vasodilatatorisch wirkenden PGI₂ in den Endothelzellen. Insgesamt überwiegen jedoch die aggregationshemmenden Eigenschaften, da Endothelzellen zu einer De-novo Synthese der Zyklooxygenase befähigt sind, während die Wirkung im Thrombozyten über die gesamte Lebensdauer erhalten bleibt (8). Die aggregationshemmende Wirkung von ASS wird bereits bei einer Tagesdosis von 100 mg/d erreicht (25). Durch eine Steigerung der Tagesdosis lässt sich jedoch kein zusätzlicher Benefit hinsichtlich der Prävention thrombotischer Ereignisse erzielen (179). Eine Limitation der Langzeittherapie mit ASS ist der Anstieg des Risikos gastrointestinaler Blutungen, was sich durch eine Dosisreduktion oder veränderte Galenik nicht wesentlich reduzieren lässt (54).

Einsatz von ASS bei koronarer Herzerkrankung

Der Einsatz von ASS zur Sekundärprophylaxe akuter Myokardischämien wurde in mehreren großen Studien untersucht. In einer fast 100.000 Patienten umfassenden Metaanalyse dieser Studien konnte ein eindeutiger protektiver Effekt von ASS bei der Sekundärprävention kardiovaskulärer ischämischer Ereignisse aufgezeigt werden (5). Auch bei Patienten nach akutem Koronarsyndrom konnte durch ASS eine deutliche Risikoreduktion ischämischer Ereignisse und der Mortalität erzielt werden (27, 128). In der über 17.000 Patienten umfassenden ISIS-2 Studie führte die Behandlung mit ASS (162,5 mg/d) für 30 Tage nach akutem Myokardinfarkt zu einer fast 50%igen Reduktion erneuter kardialer Ischämien

und zu einer 23%igen Reduktion der Mortalität (106). In der „Physicians’ Health Study“ konnte durch ASS (325 mg/d) als Primärprophylaxe im Vergleich zu Placebo eine 44% Risikoreduktion akuter Myokardischämien jedoch keine signifikante Reduktion der Mortalität im 5jährigen Beobachtungszeitraum verzeichnet werden (215). Ähnliche Ergebnisse zur Primärprophylaxe mit ASS zeigten sich in der „Thrombosis Prevention Trial“ Studie (232).

2.7.2 GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten

GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten binden selektiv an extrazelluläre Domänen des thrombozytären $\alpha_{IIb}\beta_3$ -Integrins, wodurch die Fibrinogenbindung und damit die Aggregation der Thrombozyten gehemmt werden. Im Gegensatz zu anderen aggregationshemmenden Substanzen greifen GP IIb/IIIa-Antagonisten an der gemeinsamen Endstrecke der Zellaktivierung an und erzeugen dadurch eine effektive Hemmung der Aggregation. Biochemisch gesehen handelt es sich bei der Gruppe der GP IIb/IIIa-Antagonisten um eine inhomogene Substanzklasse: Neben chimären und humanisierten Antikörperfragmenten wurden Peptide und synthetische Peptidomimetika entwickelt, die selektiv am GP IIb/IIIa Rezeptor angreifen. Hinsichtlich ihrer Bioverfügbarkeit, Rezeptoraffinität, Spezifität und Wirkungsdauer zeigen sich teilweise deutliche Unterschiede zwischen den Substanzen (173).

Abciximab

Das chimäre Antikörperfragment c7E3 / Abciximab (ReoPro[®]) war der erste klinisch getestete und für eine adjuvante Pharmakotherapie bei Koronarinterventionen zugelassene GP IIb/IIIa Antagonist. Das Antikörperfragment leitet sich aus einem murinem, gegen den humanen GP IIb/IIIa Rezeptor gerichteter Antikörper ab. Durch die Bindung an den thrombozytären Fibrinogenrezeptor (GP IIb/IIIa) wird die Aggregation effektiv gehemmt, während die Zellaktivierung und die Adhäsion der Thrombozyten an subendothelial gelegenes Kollagen nicht wesentlich gehemmt werden (42).

Die Bolusgabe von Abciximab (0,25 mg/kg KG) führt innerhalb weniger Minuten zu einer >80%igen Rezeptorblockade und einer fast kompletten Hemmung der ADP-induzierten Aggregation. Durch eine kontinuierliche Infusion (0,125 µg/kg/min) lässt sich das Ausmaß der Rezeptorblockade und der Aggregationshemmung aufrechterhalten (224). Trotz einer relativ kurzen Plasmahalbwertszeit bleiben die Rezeptorblockade und die Aggregationshemmung aufgrund einer hohen Rezeptoraffinität für einen wesentlich längeren Zeitraum bestehen. So sind 24 Std. nach Therapiebeendigung noch fast 70% der Rezeptoren blockiert und die Aggregation hat erst 60% ihres Ausgangswertes erreicht (136). Im Gegensatz zu anderen GP IIb/IIIa-Antagonisten weist Abciximab Kreuzreaktivitäten mit dem Vitronektinrezeptor und dem leukozytären β_2 -Integrin Mac1 auf (210, 220).

Der klinische Benefit von Abciximab bei Koronarinterventionen konnte durch mehrere große multizentrische Studien belegt werden. Alle Interventionsstudien konnten zeigen, dass durch eine adjuvante

Therapie mit Abciximab (0,25 mg/kg KG Bolus; 10 µg/min über 12-24 Std.) das Risiko kardialer ischämischer Ereignisse signifikant gesenkt wird. In der EPIC-Studie konnte durch Abciximab eine 35%ige Reduktion des kombinierten Endpunktes aus Tod, akutem Myokardinfarkt und erneuten Intervention 30 Tage und auch 6 Monate nach einer Koronarintervention erzielt werden (227, 240). Jedoch traten unter Abciximab signifikant häufiger postinterventionelle Blutungskomplikationen auf (2). Auch in der EPILOG- und EPISTENT-Studie konnte nach elektiver PTCA und Stentimplantation eine signifikante Reduktion ischämischer Komplikationen durch Abciximab erzielt werden (228, 229). Bei einer reduzierten und gewichtsadaptierten Heparindosierung traten in dieser Studie schwere Blutungskomplikationen unter Abciximab seltener auf. Auch in der CAPTURE-Studie konnte bei Patienten mit therapierefraktärer instabiler Angina pectoris Symptomatik durch Abciximab eine signifikante Reduktion ischämischer Ereignisse im 30 Tage Beobachtungszeitraum erzielt werden (Abbildung 3) (226). Insbesondere bei Patienten mit erhöhten Troponin-Konzentrationen als laborchemisches Zeichen einer Myokardischämie zeigte sich ein deutlicher Benefit durch die Abciximab-Therapie (89). Ein positiver Einfluss der auf den Restenoseprozess nach Stentimplantation durch die Therapie mit Abciximab wurde hingegen nicht erreicht (230). In etwa 0,5% der Fälle werden unter Abciximab schwere Thrombozytopenien ($< 20.000 / \mu\text{l}$) beobachtet, deren Ursachen im einzelnen noch unklar sind (16).

Eptifibatid

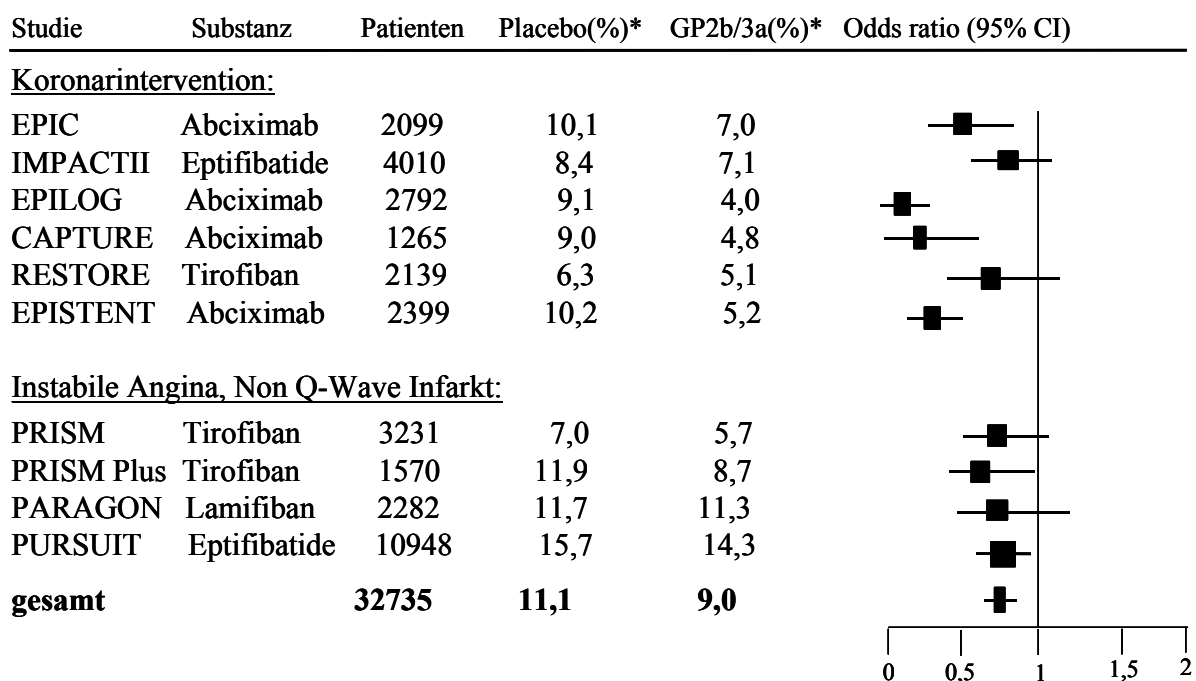
Das zyklische Heptapeptid Eptifibatid (Integrilin®) leitet sich vom natürlich vorkommenden Disintegrin Barbourin ab, das die für den GP IIb/IIIa Rezeptor spezifische Bindungssequenz KGD enthält (194). Durch intravenöse Bolusapplikation von Eptifibatid (180 µg) wird die ADP-induzierte Aggregation rasch und dosisabhängig gehemmt. Bei einer relativ kurzen Halbwertszeit und geringeren Rezeptoraffinität ist die Aggregation bereits 2-4 Std. nach Therapieende wiederhergestellt (91). Die IMPACT-II Studie untersuchte die klinische Wirksamkeit von Eptifibatid (135 µg/kg Bolus; 20-24 Std. Infusion [0,5/0,75 µg/kg/min]) im Rahmen von Koronarinterventionen. Im Vergleich zu Placebo führte Eptifibatid zu einer geringen, nicht-signifikanten Reduktion ischämischer Ereignisse. Blutungskomplikationen und Thrombozytopenien traten unter der Therapie nicht gehäuft auf (231). Man vermutet, dass die eingesetzte Dosierung der Wirksubstanz und die Dauer der Therapie nicht ausreichend waren, um eine ausreichende Aggregationshemmung in vivo zu erzielen. In der PURSUIT-Studie konnte durch Eptifibatid (180 µg/kg Bolus, 72-96 Std. Infusion [2,0/1,3 µg/kg/min]) bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (instabile Angina oder Non-Q-Wave Infarkt) eine signifikante Reduktion ischämischer Ereignisse im Vergleich zur antithrombotischen und anti-anginösen Standardtherapie erzielt werden (Abbildung 3). Jedoch war die Therapie mit vermehrten Blutungskomplikationen assoziiert, die vor allem im Rahmen von Koronarinterventionen auftraten (235).

Tirofiban

Das synthetische Tyrosinderivat Tirofiban (Aggrastat®) zählt zur Gruppe der niedermolekularen Peptidomimetika, die durch freie Diffusion rasch an die RGD-Bindungsstelle des GP IIb/IIIa Rezeptor binden, wodurch die Thrombozytenaggregation reversibel und dosisabhängig gehemmt wird (134). Die intravenöse Bolusgabe (10 µg/kg KG) führt innerhalb weniger Minuten zu einer >80%igen Hemmung der ADP-induzierten Aggregation, die durch eine Infusion mit 0,15 µg/kg/min aufrecht-erhalten werden kann. Bei einer Halbwertszeit von $1,5 \pm 0,5$ Std. ist die Thrombozytenaggregation bereits wenige Stunden nach Beendigung der Therapie wiederhergestellt (118).

In der RESTORE-Studie konnte durch Tirofiban (10 µg/kg Bolus; 36 Std. Infusion: 0,15 µg/kg/min) im Vergleich zu einer antithrombotischen Standardtherapie 2 und 7 Tage nach einer Intervention, nicht jedoch nach 30 Tagen (primärer Endpunkt) und 6 Monaten eine Reduktion kardialer ischämischer Ereignisse verzeichnet werden (Abbildung 3) (236). In der PRISM-Studie wurde bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom (instabile Angina oder Non-Q-Wave Infarkt) durch Tirofiban (48 Std.) im 30 Tage Beobachtungszeitraum kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Heparintherapie (plus Placebo) beobachtet (233). Durch die Kombination aus Tirofiban (48 Std.) und Heparin in der PRISM-Plus-Studie konnte jedoch eine signifikante Reduktion ischämischer Ereignisse im Vergleich zur Heparintherapie erzielt werden (Abbildung 3) (234).

Abbildung 3: Einsatz von GP IIb/IIIa Antagonisten bei Koronarinterventionen und akutem Koronarsyndrom



*Inzidenz Tod, akuter Myokardinfarkt nach 30 Tagen

Nach Topol, E.J. (241)

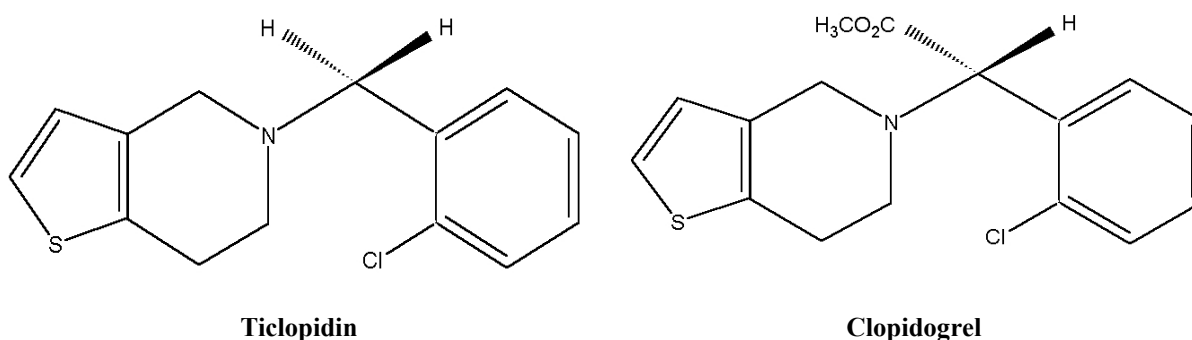
Orale GP IIb/IIIa Antagonisten

Neben den genannten intravenös verfügbaren GP IIb/IIIa Antagonisten wurden oral verfügbare Substanzen zur Langzeittherapie und Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse entwickelt. Die synthetischen RGD-Mimetika Xemilofiban, Orbofiban und Sibrafiban sind oral verfügbare Prodrugs, deren aktive Metabolite den GP IIb/IIIa Rezeptor blockieren und dadurch die Thrombozytenaggregation dosisabhängig hemmen (170). In der über 7.000 Patienten umfassenden EXCITE-Studie konnte durch eine sechsmonatige Therapie mit Xemilofiban nach Koronarintervention keine Reduktion ischämischer Ereignisse im Vergleich zur Placebogruppe (ASS + Placebo) verzeichnet werden (175). Nachdem Studien mit Orbofiban und Sibrafiban ähnlich enttäuschende Ergebnisse zeigten (28, 237), erscheint das Konzept einer Langzeittherapie mit oralen GP IIb/IIIa Antagonisten als Sekundärprophylaxe kardialer ischämischer Ereignisse zum momentanen Zeitpunkt fragwürdig.

2.7.3 Thienopyridine

Die zur Gruppe der Thienopyridine zählenden Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel (Plavix®) und Ticlopidin (Tiklyd®) sind oral verfügbare Substanzen, die nach hepatischer Metabolisierung einen thrombozytären ADP-Rezeptor und dadurch die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation hemmen. Ticlopidin und Clopidogrel sind strukturell verwandte Substanzen, die sich lediglich in einer Carboxymethylgruppe unterscheiden (Abbildung 4). Beiden Substanzen liegt das gleiche Wirkungsprinzip zugrunde, sie unterscheiden sich jedoch in ihrer Pharmakokinetik und dem Nebenwirkungsspektrum (185).

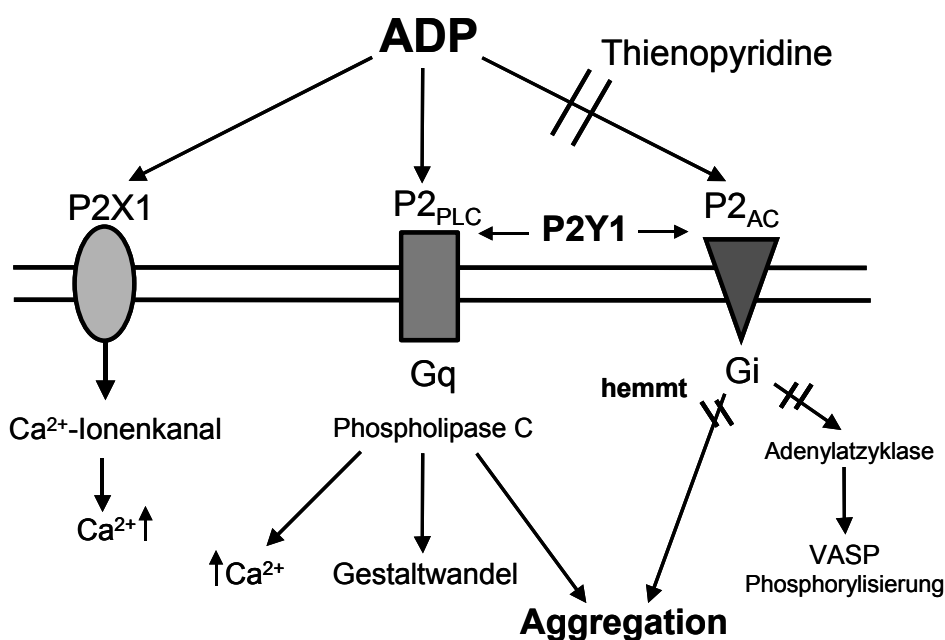
Abbildung 4: Chemische Struktur von Ticlopidin und Clopidogrel



Beide Substanzen binden reversibel an Plasmaproteine (hauptsächlich Albumin) und unterliegen einem extensiven Metabolismus. Die hepatische Metabolisierung von Clopidogrel über das Cytochrom P450 Enzymsystem (CYP 3A4) führt zur Bildung des Thiolderivats 2-Oxo-Clopidogrel und über Hydrolyse zur Bildung des aktiven Metaboliten, der primär für die antiaggregatorische Wirkung

verantwortlich ist (194). Es wurde jedoch auch eine gewisse aggregationshemmende Wirkung von Clopidogrel in vitro ohne hepatische Metabolisierung beobachtet (250). Die Elimination der Thienopyridine, deren Plasmahalbwertszeit mehrere Tage beträgt, erfolgt über Harn und Faeces (55). Die Bindung von ADP an membranständige ADP-Rezeptoren führt zur Hemmung einer AC, der Aktivierung einer PLC und einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Kalziumeinstrom und Kalziummobilisation (siehe 2.1.2 und 2.2.10). Thienopyridine wirken der ADP-induzierten Hemmung der AC entgegen, während der über Ionenkanäle vermittelte Kalziumeinstrom in die Zelle und die intrazelluläre Kalziummobilisation nicht wesentlich gehemmt werden (51, 151). Primärer Angriffspunkt der Thienopyridine ist der membranständige ADP-Rezeptor $P2Y_{12}$ / $P2Y_{AC}$, wodurch sie der ADP-induzierten Hemmung der AC und dem intrazellulären Abfall des cAMP entgegenwirken (185). Man vermutet, dass der Rezeptor durch die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen der reaktiven Thiolgruppe des aktiven Clopidogrel-Metaboliten und einem Cysteinrest des Rezeptors irreversibel gehemmt wird (195). Auch wirkt Clopidogrel der ADP-vermittelten Dephosphorylierung des zytoskelettalen Vasodilator-Stimulated Phosphor Proteins (VASP) entgegen (Abbildung 5) (85). Die über cAMP vermittelte VASP-Phosphorylierung korreliert wiederum eng mit einer Hemmung der Fibrinogenbindung an den GP IIb/IIIa Rezeptor (102).

Abbildung 5: ADP-Rezeptoren und Wirkung der Thienopyridine



Modifiziert nach Quinn MJ (185)

Beide Thienopyridine hemmen dosisabhängig die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation ex vivo. Dabei wird durch die Einnahme von 250 mg/bid Ticlopidin bzw. 75 mg/d Clopidogrel nach 3-7 Tagen die maximal zu erzielende Aggregationshemmung erreicht (55, 239). Durch eine Steigerung der Dosis

zu Therapiebeginn kann eine Beschleunigung der Aggregationshemmung erzielt werden (125, 238). Die Hemmung der ADP-induzierten Aggregation (5 µmol/l) unter einer Tagesdosis von 75 mg Clopidogrel beträgt zwischen 29 und 44%. Das Ausmaß der Aggregationshemmung wird durch eine Steigerung der Tagesdosis nicht wesentlich verstärkt (22, 30). Die Hemmung der Thrombozytenfunktion durch Thienopyridine scheint irreversibel zu sein, da selbst mehrere Tage nach Therapieende noch eine Aggregationshemmung und eine Verlängerung der Blutungszeit beobachtet werden (55). Unklar ist derzeit, welche Faktoren die individuelle aggregationshemmende Wirkung von Clopidogrel beeinflussen und welchen Einfluss Substanzen haben, die ebenfalls über das Cytochrom P-450 Enzymsystem metabolisiert werden.

Klinischer Einsatz von Thienopyridinen

Ticlopidin und Clopidogrel werden bei Patienten mit symptomatischer Atherosklerose erfolgreich zur Sekundärprophylaxe vaskulärer ischämischer Ereignisse eingesetzt. Der Einsatz von Ticlopidin umfasst, neben dem Einsatz nach Koronarinterventionen, die Sekundärprophylaxe zerebrovaskulärer Ischämien und ischämischer Komplikationen bei peripherer arterieller Verschlusskrankung (93, 109). Die CAPRIE-Studie untersuchte den Einsatz von Clopidogrel (75 mg/d) zur Sekundärprophylaxe vaskulärer ischämischer Ereignisse bei Patienten mit symptomatischer Atherosklerose (koronar, zerebral sowie pAVK). Durch die Therapie mit Clopidogrel konnte in einem 1-3jährigen Behandlungszeitraum eine signifikante Reduktion des kombinierten Endpunktes (Myokardinfarkt, Apoplex oder vaskulär bedingter Tod) im Vergleich zu ASS (325 mg/d) verzeichnet werden (225). Hinsichtlich ihres Nebenwirkungsspektrums und des Auftretens von Unverträglichkeitsreaktionen waren ASS und Clopidogrel vergleichbar. Die Ergebnisse der CAPRIE-Studie führten zur Zulassung von Clopidogrel für die Sekundärprophylaxe ischämischer Ereignisse bei Patienten mit symptomatischer Atherosklerose.

Das Nebenwirkungsspektrum von Ticlopidin umfasst ein erhöhtes Risiko für Blutungskomplikationen, Thrombozytopenien, Neutropenien (ca. 1%) sowie das Auftreten einer thrombotisch thrombozytopenischen Purpura (TTP) (<0,1%). Daneben werden Pruritus, Urtikaria, Ecchymosen und gastrointestinale Nebenwirkungen (Übelkeit / Erbrechen, Dyspepsie, Diarrhö) beobachtet (185). Clopidogrel wird im Vergleich zu Ticlopidin besser vertragen und weist eine geringere Inzidenz schwerwiegender Blutbildveränderungen auf. In sehr seltenen Fällen wird auch unter Clopidogrel das Auftreten einer TTP beobachtet (13). In der CAPRIE-Studie wurde die Langzeittherapie mit Clopidogrel (75 mg/d) insgesamt gut vertragen. Im Vergleich zu ASS traten unter Clopidogrel weniger gastrointestinale Blutungen oder Ulzera, jedoch vermehrt Diarrhöen und Exantheme auf (225).

Einsatz von Thienopyridinen bei Koronarinterventionen

Die ISAR-Studie verglich als erste den Einsatz einer vierwöchigen antiaggregatorischen Therapie mit Ticlopidin (250 mg/bid) plus ASS und einer oralen Antikoagulation mit Phenprocoumon (INR 3,5-4,5) nach koronarer Stentimplantation. Hierbei zeigte sich, dass durch die kombinierte antiaggregatorische Therapie die Inzidenz kardialer Ereignisse (Tod, akuter Myokardinfarkt, erneuter koronare Intervention) 30 Tagen nach koronarer Stentimplantation gegenüber der Therapie mit Phenprocoumon signifikant gesenkt werden konnte (Tabelle 2) (199). Auch traten in der Ticlopidin-Gruppe weniger postinterventionelle Blutungskomplikationen auf. Die positiven Auswirkungen auf die Inzidenz ischämischer kardialer Ereignisse blieben auch nach 6 Monaten bestehen, während kein positiver Einfluss auf die Restenoserate verzeichnet werden konnte (116). Auch in der dreiarmlig angelegten STARS-Studie konnte durch die Kombination aus Ticlopidin und ASS eine signifikante Reduktion postinterventioneller ischämischer Ereignisse (30 Tage) gegenüber der ASS-Monotherapie sowie der Kombination aus ASS plus Warfarin (INR 2,0-2,5) erzielt werden (127). Ähnlich positive Ergebnisse zeigten sich in der FANTASTIC- und der MATTIS-Studie, wobei insbesondere die Inzidenz nicht kardialer Ereignisse gegenüber der Cumarin-Therapie gesenkt werden konnte (Tabelle 2) (18, 243).

Tabelle 2: Vergleich einer antiaggregatorischen Kombinationstherapie mit einer oralen Antikoagulation nach koronarer Stentimplantation

	N	Kardial ischämische Ereignisse*			Nicht-kardiale Ereignisse**		
		T	C	p	T	C	p
ISAR (199)	517	1,6%	6,2%	0,01	1,2	12,3	<0,001
STARS (127)	1653	0,5%	2,7%	0,001	5,5%	6,1%	0,001
MATTIS (243)	350	5,6%	11,0%	0,37	1,7%	6,9%	0,02
FANTASTIC (18)	485	5,3%	8,3%	0,07	13,5%	21,0%	0,03

* Kombiniertes Endpunkt aus Tod, akutem Myokardinfarkt und Revaskularisation des Zielgefäßes (30 Tage).

** Kombiniertes Endpunkt aus Blutungskomplikationen, Medikamentenunverträglichkeit und sonstigen nicht-kardialen Nebenwirkungen.

T: Antiaggregatorische Kombinationstherapie (ASS plus Ticlopidin); C: Kombination aus Cumarinen plus ASS (für 4 Wochen).

Vergleich zwischen Ticlopidin und Clopidogrel nach Stentimplantation

Der Einsatz der beiden Thienopyridine in Kombination mit ASS nach koronarer Stentimplantation wurde in mehreren Studien untersucht. In einer retrospektiven Analyse von Moussa et al. zeigten Clopidogrel (75 mg/d) und Ticlopidin (250 mg/bid) vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf kardiale Ereignisse nach koronarer Stentimplantation, während unter Clopidogrel signifikant weniger nicht-kardiale Nebenwirkungen beobachtet wurden (Tabelle 3) (159). Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf Sicherheit und klinische Wirksamkeit von Clopidogrel im Rahmen von Koronarinterventionen zeigten zwei weitere nicht-randomisierte Studien (15, 152). In einer von Müller et al. durchgeführten prospektiv randomisierten Studie zeigten sich 30 Tage nach Stentimplantation keine signifikanten

Unterschiede zwischen Clopidogrel und Ticlopidin (jeweils plus ASS 100 mg/d) in Bezug auf kardiale Ereignisse. Nicht-kardiale Nebenwirkungen traten unter Ticlopidin jedoch signifikant häufiger auf (Tabelle 3) (160). Auch in der CLASSICS-Studie konnte eine signifikante Reduktion nicht-kardialer Nebenwirkungen unter Clopidogrel (primärer Endpunkt) bei vergleichbarer klinische Wirksamkeit beider Substanzen in Bezug auf kardiale Ereignisse nach koronarer Stentimplantation (sekundärer Endpunkt) verzeichnet werden (19).

Tabelle 3: Vergleich der adjuvanten Therapie mit Clopidogrel oder Ticlopidin nach koronarer Stentimplantation

Studie	Pat.	AD [#]	Kardial ischämische Ereignisse*			Nicht-kardiale Nebenwirkungen**		
			Clopidogrel	Ticlopidin	P	Clopidogrel	Ticlopidin	P
Moussa et al. (159)	1689	J	2,4%	3,1%	0,85	5,3%	10,6%	0,006
Berger et al. (15)	1327	J	0,8%	1,6%	0,05	-	-	-
Mishkel et al. (152)	875	N	2,1%	1,4%	0,57	-	-	-
Müller et al. (160)	700	N	3,1%	1,7%	0,24	4,5%	9,6%	0,01
CLASSICS (19)	1020	J	1,3%	0,9%	N.S.	4,6%	9,1%	0,005

Alle Patienten wurden nach Stentimplantation mit Clopidogrel (75mg/d) oder Ticlopidin (250 mg/bid) über einen Zeitraum von einem Monat behandelt und erhielten zusätzlich ASS (100 oder 325 mg/d).

[#] AD: 300mg Clopidogrel oder 500mg Ticlopidin als Aufsattdosis nach Stentimplantation.

* Ischämische Ereignisse: kombinierter Endpunkt aus Tod, Myokardinfarkt und erneuten Revaskularisationsmaßnahmen innerhalb von 30 Tagen.

** Nicht-kardiale Nebenwirkungen: Blutbildveränderungen (Thrombozytopenien, Neutropenien), Blutungskomplikationen oder Zeichen einer Medikamentenunverträglichkeit (Exanthem, Übelkeit/ Erbrechen, Diarrhö).

Während der Einsatz der Thienopyridine Ticlopidin und Clopidogrel und deren klinischer Benefit im Rahmen von Koronarinterventionen durch mehrere Interventionsstudien gut belegt ist, ist aus klinischen Studien nur wenig über deren Einfluss auf die Expression thrombozytärer Membranrezeptoren bekannt. Der Einfluss von Clopidogrel auf die Thrombozytenfunktion wurde bisher v.a. mit Hilfe von Aggregationsmessungen untersucht, die lediglich den Endpunkt der Zellaktivierung erfasst und Aspekte wie Zelldegranulation, Rezeptorinternalisierung und -rekrutierung nicht messen kann. Untersuchungen der Thrombozytenfunktion im Rahmen von Koronarinterventionen beinhalteten bisher entweder keinen Einsatz von Thienopyridinen oder einen Therapiebeginn erst nach erfolgreicher Intervention. Wenig bekannt ist, wie die Thrombozytenfunktion durch eine vor einer geplanten Intervention begonnenen Clopidogrel-Therapie mit Aufsattdosis beeinflusst wird. Der Einfluss von Clopidogrel auf die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten, die einen wichtigen Vermittler der Leukozytenaktivierung im Hämostaseprozess darstellt, wurde im Rahmen von klinischen Studien bisher nicht untersucht.

3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel der Arbeit ist eine differenzierte Analyse der Expression thrombozytärer Membranrezeptoren, der Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen sowie der Thrombozytenaggregation bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die vor einer geplanten Koronarintervention mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel behandelt werden.

3.1 Fragestellungen

- a) In welchem Ausmaß wird die Expression der thrombozytären Membranrezeptoren P-Selektin, GP53, GP Ib, GP IIb/IIIa, PAC-1 und die Fibrinogenbindung unter einer Therapie mit Clopidogrel beeinflusst?
- b) In wie weit beeinflusst die Therapie mit Clopidogrel die Reaktivität der Thrombozyten und die Thrombozytenaggregation unter Stimulation mit den Agonisten ADP und TRAP-6 ex vivo?
- c) Welchen Einfluss hat die Therapie mit Clopidogrel auf das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion an Leukozyten?
- d) In welchem Ausmaß und welchem zeitlichen Rahmen beeinflusst eine Aufsättigungsdosis mit Clopidogrel die Thrombozytenaktivierung und -aggregation vor geplanter Koronarintervention?
- e) Welche Faktoren beeinflussen die Expression thrombozytärer Membranrezeptoren, die Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion und die Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel?
- f) Welchen Einfluss hat Clopidogrel auf das Blutbild und die plasmatische Gerinnung?

4 Methodik

4.1 Studienkollektiv

4.1.1 Einschlusskriterien

In die Studie wurden 40 Patienten (33 Männer und 7 Frauen) mit koronarer Herzerkrankung eingeschlossen, die zur Durchführung einer elektiven Koronarintervention stationär in der Abteilung für Kardiologie des Universitätsklinikums Essen aufgenommen wurden. Eingeschlossen wurden Patienten mit angiographisch vorbeschriebenen Koronarstenosen und Patienten mit bekannter stenosierender koronarer Herzerkrankung und erneuter pektanginöser Beschwerdesymptomatik oder einem Ischämiehinweis im Belastungs-EKG. Alle Patienten wurden über das Ziel sowie den Ablauf der Studie aufgeklärt und gaben hierzu ihr Einverständnis. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität Essen genehmigt.

4.1.2 Ausschlusskriterien

Für die Studie wurden die folgenden Ausschlusskriterien definiert:

- Patienten mit akutem Koronarsyndrom im Sinne einer instabilen Angina pectoris Symptomatik oder eines akuten Myokardinfarktes.
- Bekannte Kontrastmittelallergie des Patienten (anamnestisch).
- Entzündliche Prozesse jeglicher Genese mit dem Vorliegen einer Leukozytose bei Aufnahme.
- Patienten mit Kardiomyopathien, angeborenen oder erworbenen Klappenfehlern und Zustand nach prothetischem Herzklappenersatz, entzündlichen Herzerkrankungen sowie klinisch relevanten Herzrhythmusstörungen.
- Akuter Myokardinfarkt innerhalb der letzten 30 Tage.
- Größere operative Eingriffe innerhalb der letzten 30 Tage.
- Störungen des plasmatischen Gerinnungssystems: Mangel an Protein C, Protein S, Antithrombin III, Hämophilien oder Faktor V Leiden.
- Antikoagulation mit Cumarinderivaten.
- Thrombozytenrezeptordefekte oder Thrombozytopenien ($<100.000 / \mu\text{l}$).
- Bekannte Medikamentenunverträglichkeiten gegenüber ASS oder Clopidogrel.
- Bestehende maligne Grunderkrankungen.

4.2 Therapie mit Clopidogrel

Zur stationären Aufnahme erhielten die Patienten, sofern kein Ausschlusskriterium erfüllt war, 300 mg Clopidogrel (Plavix[®], Sanofi Synthelabo) als Aufsättigungsdosis und ab dem zweiten Therapietag eine Tagesdosis von 75 mg (morgendliche Einnahme). Alle Patienten waren zum Aufnahmezeitpunkt mit ASS 100 mg/d für mindestens zwei Wochen vorbehandelt. Die Therapie mit ASS wurde bei allen Patienten beibehalten. Die geplante Koronarintervention sollte 24-72 Stunden nach Therapiebeginn mit Clopidogrel durchgeführt werden. Wurde den Patienten ein Stent implantiert oder wurde eine adjuvante Brachytherapie durchgeführt, erhielten sie Clopidogrel (75 mg/d) für 4 Wochen bzw. 6 Monate. Die Clopidogrel-Therapie wurde nach dem dritten Tag beendet, sofern keine Koronarintervention durchgeführt wurde. Auch wurde das Medikament im Fall von klinisch manifesten Nebenwirkungen abgesetzt. Diese umfassten das Auftreten spontaner Blutungen, Thrombozytopenien, thrombozytopenische Purpura, Neutropenien, gastrointestinale Nebenwirkungen oder sonstige Zeichen einer Medikamentenunverträglichkeit.

4.3 Koronarangiographie und -intervention

Die Herzkatheteruntersuchung und die Koronarintervention wurde bei allen Patienten nach definierten Laborstandards durchgeführt: Nach der Punktion der Arteria femoralis wurde eine arterielle Schleuse (6 oder 8F) in das Gefäß eingebracht. Über die liegende Schleuse wurden die linke Herzkammer und die Koronararterien mit entsprechenden Kathetern sondiert. Zu Beginn der diagnostischen Koronarangiographie erhielten die Patienten 5.000 IE unfractioniertes Heparin als Bolus (Liquemin[®], Roche). Für die Angiographien wurde ausschließlich nicht-ionische Kontrastmittel verwendet: Iodixanol (Visipaque[®], Nycomed), Iohexol (Omnipaque[®], Schering) oder Iopromid (Ultravist[®], Schering). Die Kontrastmittelmenge richtete sich nach Art und Komplexität des Eingriffs.

Bei Vorliegen hämodynamisch relevanter Koronarstenosen wurde die Koronarintervention unmittelbar im Anschluss an die diagnostische Koronarangiographie durchgeführt. Für die Intervention wurde eine zweite Heparindosis appliziert (insgesamt 100 IE/kg), postinterventionell wurde kein Heparin gegeben. Die Indikation zur Durchführung der Ballonangioplastie und Stentimplantation blieb dem Untersucher überlassen. Der Einsatz von GP IIb/IIIa Rezeptorantagonisten war auf das Auftreten akuter Myokardischämien sowie schwieriger und komplexer Koronarinterventionen beschränkt. Bei Patienten mit dem Rezidiv einer In-Stent Restenose wurde eine PTCA mit adjuvanter intrakoronarer Brachytherapie durchgeführt. Da das Risiko von thrombotischen Verschlüssen nach intrakoronarer Brachytherapie erhöht ist, erhielten diese Patienten postinterventionell ebenfalls Clopidogrel plus ASS. Unmittelbar nach dem Eingriff wurde die arterielle Schleuse mit den Angioseal[®]-Verschlusssystem verschlossen und die Patienten wurden 6-8 Std. nach dem Eingriff mobilisiert.

4.4 Blutentnahmen und Probenaufarbeitung

Die Blutentnahmen für die Analysen der Thrombozytenfunktion wurden am Aufnahmetag, unmittelbar vor Einnahme der Aufsättigungsdosis sowie 6, 24 und 72 Std. nach Therapiebeginn durchgeführt. Eine zusätzliche Blutentnahme erfolgte 7 Tage nach Therapiebeginn im Rahmen einer ambulanten Nachuntersuchung.

4.4.1 Blutentnahme und Probenaufarbeitung für die Thrombozytenfunktionsanalytik

Zu den genannten Zeitpunkten wurden dem Patienten ca. 20 ml Blut aus einer ungestauten Unterarmvene mit einer 1,0 mm Kanüle in eine mit Natrium-Citrat (0,11 mmol/l) gefüllte Monovette (Sarstedt, Nümbrecht) entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch vorsichtige Aspiration, um eine Zellaktivierung durch die Blutentnahme zu minimieren. Zusätzlich wurden Blutproben zur Bestimmung des Blutbildes und der plasmatischen Gerinnung entnommen (siehe 4.7).

Die Aufarbeitung der Blutproben für die Thrombozytenfunktionsanalytik erfolgte innerhalb von 30 Minuten nach der Blutentnahme, um eine artifizielle in vitro Aktivierung der Thrombozyten durch die Lagerung zu reduzieren. Im ersten Schritt wurde das antikoagulierte Vollblut mit einer Mg^{2+} - und Ca^{2+} -freien PBS-Pufferlösung (pH 7,2) auf eine Thrombozytenkonzentration von 20.000 / μ l verdünnt, um das Ausmaß einer spontanen Thrombozytenaggregation in vitro zu minimieren. Jeweils 40 μ l des verdünnten Vollblutes wurden für 5 Minuten mit den Agonisten ADP [0,5 und 5,0 μ mol/l] und TRAP-6 [5,0 μ mol/l] bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Inkubation mit den beiden Agonisten wurde konzentrationsabhängig eine vermehrte Expression aktivierungsabhängiger Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche induziert. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten mit entsprechenden fluorochrommarkierten Antikörpern bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Jeweils eine Probe wurde ohne Zugabe eines Agonisten mit den Antikörpern inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 1 ml einer 1%igen Formaldehydlösung abgestoppt und die Proben wurden bis zur Analyse im Durchflusszytometer in Dunkelheit und bei Raumtemperatur gelagert.

Für die Analyse der thrombozytären Fibrinogenbindung und der Thrombozytenaggregation wurde plättchenreiches (PRP) und plättchenarmes Plasma (PPP) durch Zentrifugation (150 g und 700 g, 15 min) aus dem antikoagulierten Vollblut gewonnen.

4.4.2 Agonisten für die in vitro Stimulation

Adenosindiphosphat

Adenosin-5'-diphosphat (ADP) ist ein aus Adenin, Ribose und zwei miteinander verknüpften Phosphorsäureestern zusammengesetztes Nukleotid. ADP zählt zu den physiologischen Thrombozytenaktivatoren. Es bindet an membranständige thrombozytäre ADP-Rezeptoren und führt über die Aktivierung einer PLC sowie membranständige Ionenkanäle zu einem Kalziumanstieg in der Zelle

und über die Hemmung einer AC zum Absinken der intrazellulären cAMP-Konzentration (siehe 2.2.10). In den Thrombozyten gebildetes ADP wird in den intrazellulären Granula gespeichert und aktivierungsabhängig freigesetzt. Für die Stimulation der Thrombozyten in vitro wurde hochgereinigtes (95-99%) Adenosin-5'-diphosphat ($C_{10}H_{15}N_5O_{10}P_2$) bakteriellen Ursprungs (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) verwendet.

Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6

Die Protease Thrombin ist eine der stärksten physiologischen Thrombozytenaktivatoren. In vitro führt Thrombin zu einer ausgeprägten Thrombozytenaktivierung und -aggregation. In dieser Untersuchung wurden die in vitro Stimulationen mit dem Thrombin Rezeptor Aktivator Peptid 6 (TRAP-6) (Bachem, Heidelberg) durchgeführt. Das Hexapeptid TRAP-6 [Aminosäuresequenz: H-Ser-Phe-Leu-Leu-Arg-Asn-OH (SFLLRN)] weist Homologien mit dem aminoterminalen Rezeptorende (AS-Sequenz: SFLLRNPNDKYEPF) des Thrombinrezeptors auf, das nach proteolytischer Spaltung durch Thrombin freigelegt wird und intramolekular mit einem zentralen Rezeptorabschnitt bindet. Durch die Bindung von SFLLRN an die Residuen 42-47 des zentralen Rezeptorabschnittes werden intrazelluläre Aktivierungsmechanismen initiiert, die schließlich zur Thrombozytenaktivierung mit Degranulation und Aggregation führen (119, 245). Die durch Thrombin ausgelöste Fibrinpolymerisation in vitro wird unter SFLLRN nicht beobachtet. Das Hexapeptid TRAP-6 / SFLLRN stellt somit einen geeigneten Agonisten für die Analyse der über den Thrombinrezeptor vermittelten Thrombozytenaktivierung dar.

4.5 Durchflusszytometrische Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Die Durchflusszytometrie (DFZ) hat sich zu einer der wichtigsten analytischen Methoden für die immunologische Zelldiagnostik entwickelt. Die Analyse der Bindung spezifischer mono- und polyklonaler Antikörper an entsprechende zelluläre Bindungsstellen ermöglicht eine Charakterisierung und Typisierung der Zellen. Auch im Bereich der Thrombozytenfunktionsdiagnostik hat die DFZ in den letzten Jahren an Bedeutung gewonnen. Sie bietet einen methodischen Zugang zu verschiedenen Teilsequenzen der Zellaktivierung, dem Nachweis von Rezeptordefekten, der Thrombozytenreifung sowie dem Nachweis von Thrombozytenalloantikörpern (198).

4.5.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Ein Durchflusszytometer ist ein optisches Messsystem, das Streulicht- und Fluoreszenzsignale einzelner in einem Flüssigkeitsstrom fokussierter Partikel nach Kontakt mit einem Laserlichtstrahl analysiert. Zur durchflusszytometrischen Untersuchung sind Zellen jeder Herkunft geeignet, sofern sie als Suspension von Einzelzellen vorliegen. Die Zellen werden in einer Messkammer von einem fokussierten Laserlichtstrahl (i.d.R. 488 nm Argonlaser) beleuchtet. Die von den Einzelzellen ausgehenden Lichtsignale (Fluoreszenz- und Streulichtemission) werden von einem optischen Detektions-

system aufgefangen und quantifiziert. Die Analyse einer Probe besteht aus der Summe vieler schnell aufeinanderfolgender Einzelmessungen (204).

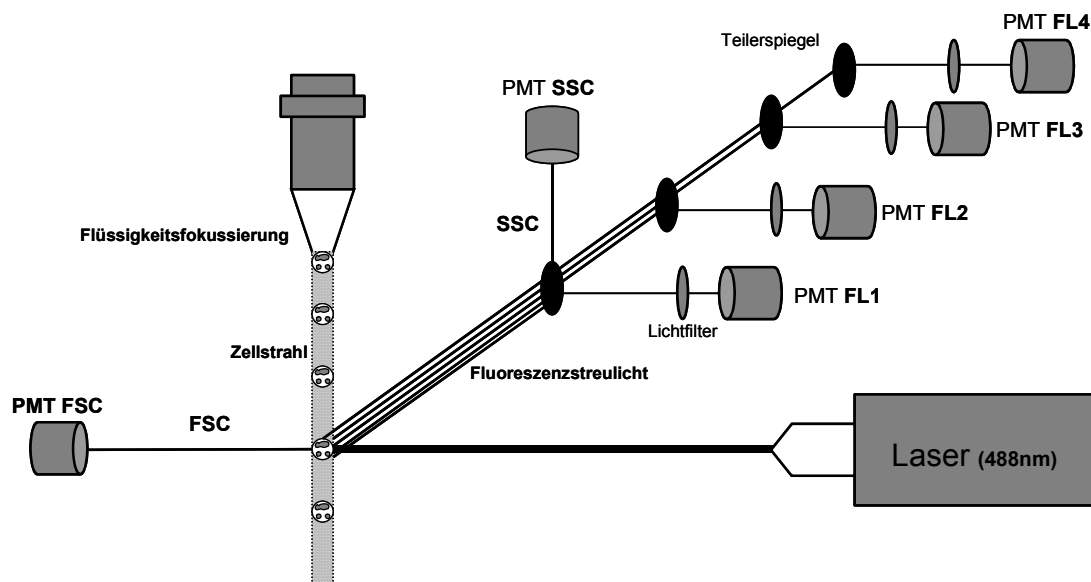
Für die Analyse der Fluoreszenz- und Streulichtemissionen werden die Zellen zuvor mit Antikörpern gegen spezifische Zellepitope versetzt. Die Antikörper werden entweder als direkte Fluorochromkonjugate, biotinyliert oder unkonjugiert mit entsprechenden 2. Stufe Reagenzien (fluorochromierte Anti-Immunglobulinkonjugate, die an den primären Antikörper gebunden sind) verwendet. Als Fluorochrome werden Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Cy5 und Peridinin-Chlorophyll (PerCP) eingesetzt. Die Fluorochrome absorbieren Lichtenergie des Laserstrahls über einen charakteristischen Frequenzbereich. Das Fluoreszenzlicht entsteht durch die Photonenemission beim Rücksprung angeregter Elektronen auf ihr ursprüngliches Energieniveau. Der Frequenzbereich, der eine fluoreszierende Verbindung anregt, ist das für den Farbstoff charakteristische Exzitationsspektrum, welches weitgehend mit dem Absorptionsspektrum übereinstimmt. Weitere gemessene Charakteristika der Zellen sind die Streulichteigenschaften: trifft der Laserstrahl auf eine Zelle, streut diese aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften das Licht mit unterschiedlicher Qualität und Quantität. Die Lichtstreuung wird durch die Querschnittsfläche der Zelle, den Retraktionsindex, der Membranstruktur und intrazellulären Bestandteilen (Vakuolen, Granula) beeinflusst. Detektoren im Durchflusszytometer messen die Lichtstreuung im Kleinwinkelbereich $0-10^\circ$ des einfallenden Lichtstrahls („Forward Scatter“ [FSC]) und das im 90° Winkel gestreute Licht („Side Scatter“ [SSC]). Mittels der Streulichtparameter lassen sich Thrombozyten, Leukozyten und ihre Subpopulationen identifizieren (204).

Ein Durchflusszytometer besteht aus einem Flüssigkeitssystem, einem optischen System sowie einem System der Signalverarbeitung und Datenauswertung. Das Flüssigkeitssystem setzt sich aus einer Zuleitung der Trägerflüssigkeit zur Messkammer und einer Leitung für den Transport der Zellen vom Proberöhrchen zur Messkammer zusammen. In der Messkammer werden die Zellen nach dem Verlassen einer Kapillare durch die laminar strömende Trägerflüssigkeit erfasst und als Einzellzellen an einer Küvette vorbeigeführt, wo sie auf den Laserstrahl treffen. Das optische System gliedert sich in einen Anregungs- und einen Detektionsteil. Der Anregungsteil besteht aus dem Lasergenerator und einem Prismensystem, das den Laserstrahl umlenkt und auf die Messkammer fokussiert. Der Detektionsteil besteht aus Baugruppen zur Messung des Streulichts und der Fluoreszenz. Dabei wird das Licht durch Sammeloptiken, Blenden und spezielle Filter in Streulicht und Fluoreszenzlicht mit den verschiedenen Farbbereichen getrennt (Abbildung 6).

Die ankommenden Lichtsignale werden durch Photodetektoren von optischen Signalen in elektrische Pulse umgewandelt. Spezielle Photoröhren (PMT) werden zur Verstärkung der relativ schwachen Fluoreszenz- und Lichtsignale eingesetzt. Das Auftreffen von Lichtphotonen auf eine Photokathode führt zur Elektronenfreisetzung, die ihrerseits durch angelegte Hochspannung mehrfach verstärkt wird. Durch die Änderung der angelegten Spannung an die PMT wird das ankommende Signal entsprechend

verstärkt. Die Abgrenzung der von einer Zelle generierten Signale gegenüber Rausch- oder Störsignalen wird mit Hilfe von elektronischen Schwellen („Threshold“) vorgenommen, die sich auf einen bestimmten Auslöseparameter (z.B. FSC) richten. Ein Analog- / Digitalwandler konvertiert die registrierten Signalintensitäten, die dann computergestützt als Punktwolken, Histogramm- oder Häufigkeitsverteilungen dargestellt werden können (204).

Abbildung 6: Schematischer Aufbau eines analytischen Durchflusszytometers



4.5.2 Messprinzip der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Die DFZ bietet einen Zugang für die Analyse verschiedener Teilaspekte der Thrombozytenaktivierung. Sie erlaubt die Analyse morphologischer Veränderungen der Zelle, Aktivierung und Veränderungen des Zytoskeletts, Kalziummobilisation, Freisetzung von Granulainhaltsstoffen oder Mikropartikeln, konformativer Veränderungen membrangebundener Rezeptoren und der Fibrinogenbindung an die Zelloberfläche (147).

Ein zentraler Aspekt der Zellaktivierung ist die zelluläre Kalziummobilisation mit dem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration, deren Änderungen durchflusszytometrisch über Färbungen mit Fluo-3 / AM gemessen werden kann. Aktivierte Thrombozyten ändern ihre Form von diskoiden Zellen zu kugeligen Partikeln (Sphärozyten), die zahlreiche lange und filigrane Pseudopodien ausbilden. Dieser Formwandel spiegelt sich in einer Änderung der Streulichteigenschaften der Zellpopulation wider. Die dreidimensionalen Zytoskelettveränderungen werden durch die Kontraktion von Aktin- und Myosinfibrillen hervorgerufen, die durchflusszytometrisch mit Antikörpern gegen thrombozytäres Myosin gemessen werden können (258). Auch können die durch Membranverschiebungen von der Zelloberfläche abgespalten Mikropartikel über ihre Streulichteigenschaften identifiziert werden (37).

Aktivierungsabhängig gelangen die intrazellulären Granula über das OCS an die Zelloberfläche, wo sie ihre Inhaltsstoffe freisetzen und ihre membranständigen Rezeptoren (P-Selektin, GP 53) auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche kann durch spezifische Antikörper gegen diese Rezeptorepitope bestimmt werden (144). Auch die aktivierungsabhängige Internalisierung des GP Ib-V-IX Rezeptorkomplexes in das OCS kann bestimmt werden (103). Neben einer Quantifizierung des GP IIb/IIIa Rezeptors kann die Expression des aktivierten und in seiner Konformation geänderten Rezeptors, wie auch das Ausmaß der Fibrinogenbindung über spezifische Antikörper analysiert werden (130, 207, 223). Für die Analyse von Thrombozytenaktivierung und -funktion haben sich die Membranrezeptoren P-Selektin, GP 53, GP Ib und der aktivierte GP IIb/IIIa Rezeptor als geeignete Surrogatmarker einer Zellaktivierung erwiesen (198). Die Analyse der Rezeptorexpression nach Stimulation mit ADP, TRAP-6 oder anderen Agonisten erlaubt eine Beurteilung der Reaktivität bzw. Funktion der Thrombozyten ex vivo (137, 147).

4.5.3 Analyse von Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen

Auch die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten können mit Hilfe der DFZ analysiert werden. Die hierzu beschriebenen Ansätze basieren auf dem Prinzip, dass Thrombozyten- und Leukozytenpopulationen im Vollblut durch spezifische Antikörper unterschiedlicher Fluoreszenz markiert werden können (129, 180). Durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale in einer Punktwolke können so Leukozyten identifiziert werden, die Thrombozyten auf ihrer Oberfläche gebunden haben (siehe 4.5.7). Das Ausmaß der Thrombozytenadhäsion an Leukozyten kann im unstimulierten Vollblut sowie nach in vitro Stimulation der Zellen analysiert werden.

4.5.4 Analyse von Thrombozytenaktivierung und -funktion

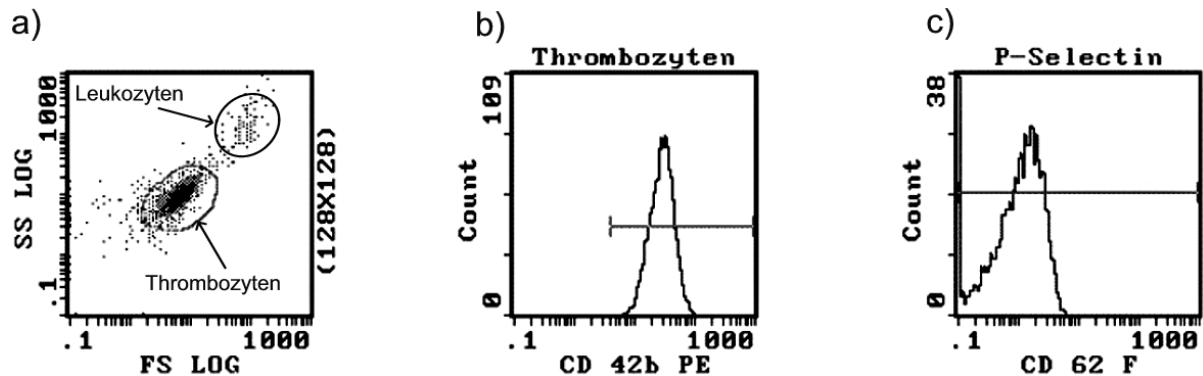
Die zur Analyse von Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen eingesetzte Methodik der Durchflusszytometrie wurde im Rahmen dieser Promotionsarbeit in der Abteilung für Kardiologie der Universität Essen neu etabliert.

Die Analysen wurden an einem EPICS XL Durchflusszytometer mit Hilfe der System II Software (Beckman Coulter, Krefeld) durchgeführt. Die Identifizierung der Thrombozytenpopulation in der Zellsuspension erfolgte aufgrund ihrer charakteristischen Streulichteigenschaften im Laserlicht und der Bindung fluorochrommarkierter MoAbs gegen die konstitutiven Membranrezeptoren GP IIb/IIIa (CD 41) und GP Ib (CD 42b). In der so identifizierten Thrombozytenpopulation wurde die Expression der verschiedenen Membranrezeptoren analysiert (Abbildung 7).

Die Expression der Membranrezeptoren P-Selektin, GP 53, GP Ib und des aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche wurde in unstimulierten Zellsuspensionen sowie nach Stimulation mit ADP und TRAP-6 analysiert (Abbildung 8). Das Ausmaß der Rezeptorexpression auf

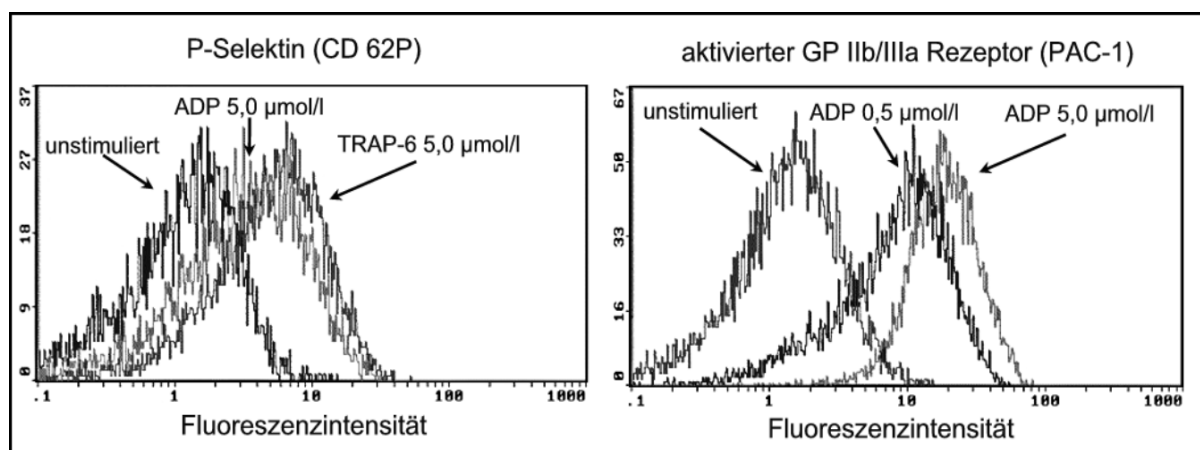
der Zelloberfläche wurde über die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der spezifischen zellgebundenen MoAbs quantifiziert. Die Fluoreszenzintensität der unspezifisch bindenden Antikörper gegen IgG und IgM wurde von den Fluoreszenzsignalen der spezifisch bindenden MoAbs subtrahiert. Pro Messvorgang wurden 10.000 Thrombozyten (jeweils als Doppelansatz) analysiert. Die MFI aus den Messungen wurde mit Hilfe definierter Fluoreszenzpartikel in Antikörperbindungsstellen pro Zelle umgerechnet (siehe 4.5.6).

Abbildung 7: Identifizierung der Thrombozytenpopulation und Analyse der Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche



- Identifizierung der Thrombozytenpopulation (Leukozyten) aufgrund ihrer Streulichteigenschaften.
- Bestätigung durch die Expression des konstitutiven Thrombozytenrezeptors GP Ib (CD 42b) durch den PE-markierten MoAb SZ2.
- Expression von P-Selektin (CD 62P) in der Thrombozytenpopulation [Schnittmenge aus a) und b)] mittels des FITC-markierten MoAbs CLB / Tromb6.

Abbildung 8: Beispiel für Expression von P-Selektin und des aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptors auf der Zelloberfläche nach in vitro Stimulation



Die Analyse der fixierten und markierten Blutproben erfolgte innerhalb von 3 Stunden nach der Probenaufarbeitung (siehe 4.4.1). Vorversuche konnten zeigen, dass sich die Fluoreszenzexpression der zellgebundenen MoAbs in den fixierten Blutproben in diesem Zeitraum nicht signifikant ändert. Die Messkonstanz des Durchflusszytometers wurde mit Partikeln definierter Fluoreszenzintensität (Immuno-Check[®], Beckman Coulter) zu Beginn jedes Messtages kontrolliert.

4.5.5 Antikörper

Die gegen die Membranrezeptoren GP Ib und GP IIb gerichteten MoAbs P2 und SZ2 dienten der Identifizierung der Thrombozytenpopulation sowie der Quantifizierung der Rezeptorexpression. Beide Rezeptoren sind konstitutiv auf der Thrombozytenoberfläche exprimiert und werden aktivierungsabhängig auf die Zelloberfläche rekrutiert bzw. teilweise in die Zelle internalisiert. Der Antikörper PAC-1 bindet spezifisch an eine Ligandenbindungsstelle des aktivierten und in seiner Konformation veränderten GP IIb/IIIa Rezeptors. Die Antikörper CLB/Thromb6 und CLBGran/12 binden an die in den Granula gespeicherten Membranrezeptoren P-Selektin und GP 53, die nach aktivierungsabhängiger Exozytose auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Der gegen das „Leukocyte Common Antigen“ gerichtete MoAb ALB12 diente der Identifizierung der einzelnen Leukozytenpopulationen, da dieses Epitop auf Thrombozyten oder Erythrozyten nicht exprimiert wird. Eine unterschiedlich starke Rezeptorexpression auf den verschiedenen Subpopulationen der Leukozyten erlaubt zusammen mit den Streulichteigenschaften eine Unterteilung in Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten.

Alle in der Studie verwendeten Antikörper (Beckman Coulter, Krefeld / Becton Dickinson, Heidelberg / DAKO, Hamburg) waren direkt mit den Fluorochromen Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) markiert. Die Bestimmung der unspezifischen Rezeptorbindung an die Zellen erfolgte mit Hilfe von Antikörpern gegen IgG- und IgM. Für die Analyse der thrombozytären Fibrinogenbindung wurde ein polyklonaler, gegen Fibrinogen gerichteter Antikörper (DAKO) verwendet.

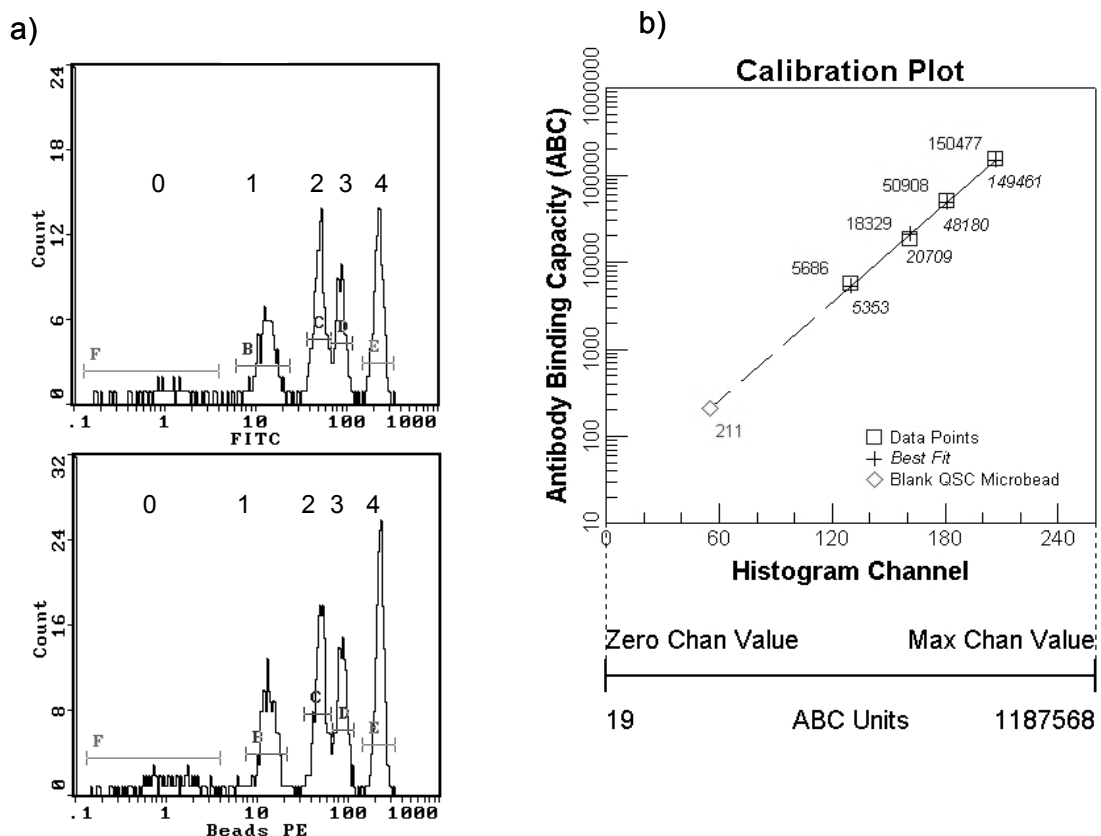
Tabelle 4: Antikörper für die durchflusszytometrischen Analysen

Zellrezeptor (-epitop)	CD	Antikörperklon		Fluoreszenz
P-Selektin	CD 62P	CLB/Tromb6	IgG	FITC
GP 53	CD 63	CLBGran/12	IgG	FITC
GP IIb	CD 41	P2	IgG	FITC / PE
aktivierter GP IIb/IIIa	-	PAC-1	IgM	FITC
GP Ib	CD 42b	SZ2	IgG	PE
Leukocyte common antigen	CD 45	ALB12	IgG	FITC
Fibrinogen (-fragmente)	-	F11 (polyklonal)		FITC

4.5.6 Berechnung der zellulären Antikörperbindungsstellen

Die Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen der verschiedenen MoAbs erfolgte mit Hilfe der Quantum Simply Cellular[®] Beads (Sigma-Aldrich, Deisenhofen). Hierbei handelt es sich um Partikelpopulationen, die jeweils eine definierte Menge fluoreszierender MoAbs binden können. Über die Antikörpermenge, welche die Partikel der einzelnen Populationen binden und die Fluoreszenzintensitäten der Antikörper in den Populationen können sogenannte Antikörperbindungskapazitäten (ABC) für die zu analysierenden Zellen errechnet werden (200). Zur Bestimmung der ABC wurden die Kalibrationsbeads mit den eingesetzten Antikörpern inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten der MoAbs in den jeweiligen Partikelpopulationen gemessen. Über die gemessene mittlere Fluoreszenzintensität der MoAbs und den vom Hersteller vorgegebenen ABC für die Partikel wurde eine Regressionsgerade errechnet (Abbildung 9). Anhand dieser Regressionsgeraden konnte die Fluoreszenzintensität des MoAbs in einer Zellpopulation in eine entsprechende ABC umgerechnet werden. Die Ermittlung der Regressionsgeraden für die einzelnen Antikörper und die Umrechnung in ABC-Einheiten erfolgte mit Hilfe der QuickCal[®] Software (Sigma-Aldrich).

Abbildung 9: Berechnung der Antikörperbindungskapazität



a) Messung des Fluoreszenzexpression des jeweiligen fluorochrommarkierten (FITC / PE) Antiköpers auf einer Negativkontrolle (0) und den definierten Eichpartikeln (1-4).

b) Erstellung einer Regressionsgeraden zur Kalibration, basierend auf den gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten der Antikörper und den vom Hersteller bestimmten Bindungskapazitäten für die einzelnen Populationen.

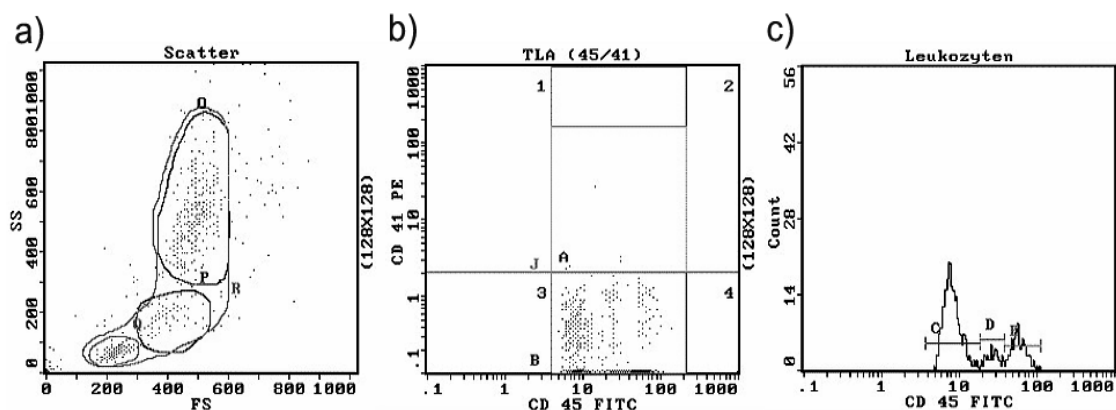
4.5.7 Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion

Die Identifizierung der Leukozyten und ihrer Subpopulationen in der Zellsuspension erfolgte aufgrund ihrer charakteristischen Streulichteigenschaften sowie der Bindung des FITC-markierten MoAbs ALB 12 gegen CD 45. Die Thrombozyten wurden durch den gegen den GP IIb/IIIa Rezeptor gerichteten und PE-markierten MoAb P2 identifiziert. Die Messung der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion (TLA) in der Leukozytenpopulation erfolgte durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale der beiden MoAbs. Als TLA wurden CD 45-„positive“ Leukozyten definiert, die CD 41-„positive“ Thrombozyten gebunden hatten. Zu den einzelnen Messzeitpunkten wurden jeweils ADP- und TRAP-stimulierte sowie unstimulierte Vollblutproben analysiert (Abbildung 10 und 11). Das Ausmaß der TLA-Bildung wurde als Prozentsatz der Thrombozytenadhäsion an der Gesamtleukozytenzahl (4.000-5.000 Leukozyten pro Messvorgang) ausgedrückt. Durch ein möglichst enges Zeitfenster zwischen Blutentnahme und Messung (30 Min.) sowie eine direkte Fixierung der Zellsuspensionen nach der Probenaufarbeitung wurde versucht, das Ausmaß einer artifiziellen Adhäsion in vitro zu minimieren.

4.5.8 Thrombozytäre Fibrinogenbindung

Die Analyse der Fibrinogenbindung erfolgte im PRP, das durch Zentrifugation gewonnen und mit PBS-Puffer auf eine Endkonzentration von 20.000 / μ l verdünnt wurde. Das Ausmaß der thrombozytären Fibrinogenbindung wurde durch den FITC-markierten polyklonalen Antikörpers F11 / Anti-Fibrinogen (DAKO) quantifiziert. Dieser Antikörper bindet an zellgebundenes Fibrinogen, Fibrin sowie die Fibrinogenfragmente D, E, X und Y. Die Fibrinogenbindung wurde in einer unstimulierten Zellsuspensionen sowie nach Stimulation mit ADP und TRAP analysiert. Die MFI der zellgebundenen Antikörper wurde als Maß der thrombozytären Fibrinogenbindung verwendet, da eine Umrechnung in ABC bei polyklonalen Antikörpern technisch nicht möglich ist.

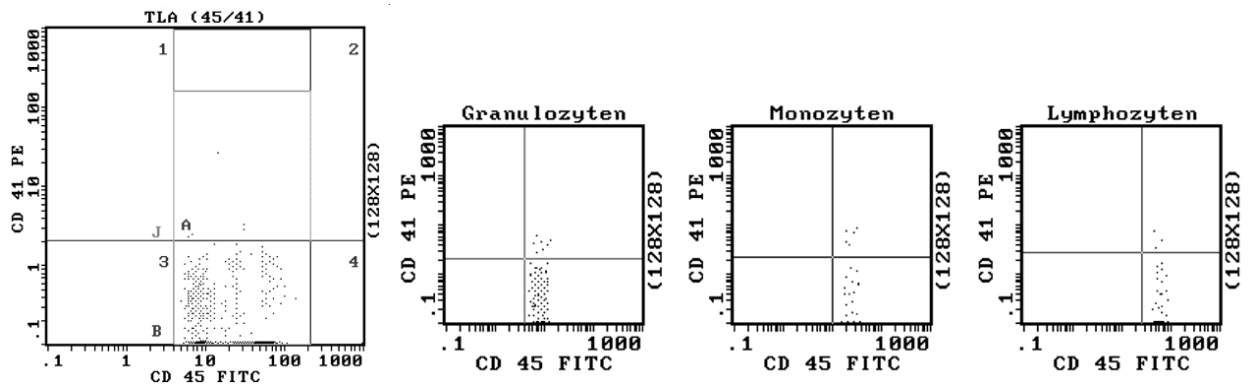
Abbildung 10: Analyse der Thrombozytenadhäsion in der Leukozytenpopulation



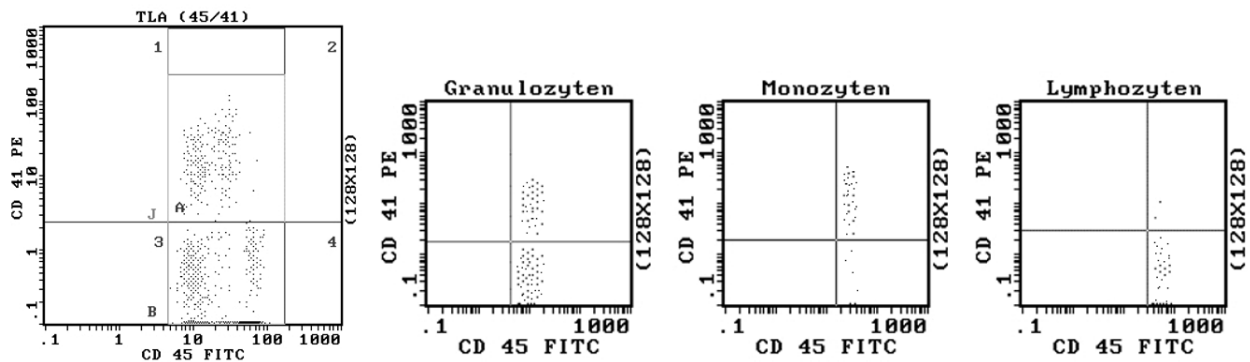
- a) Identifizierung der Leukozytenpopulation (Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) aufgrund ihrer Streulichteigenschaften.
- b) Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale der CD45-positiven Leukozyten und der CD41-positiven Thrombozyten.
- c) Unterteilung der Leukozyten durch die unterschiedlich starke Expression des CD45 Epitops in Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten.

Abbildung 11: Beispiel für die TLA-Bildung nach in vitro Stimulation

a) Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion im unstimulierten Vollblut



a) Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion nach in vitro Stimulation

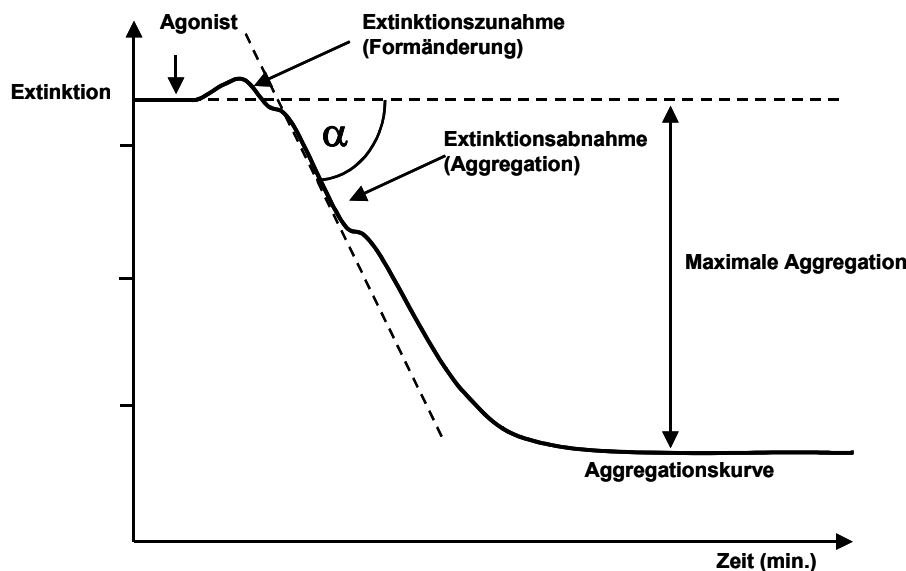


4.6 Aggregometrie

Die Thrombozytenaggregation wurde im PRP entsprechend der Messmethode nach Born analysiert (23). Das Prinzip der turbidimetrischen Aggregometrie beruht auf der Änderung der Transmission eines Lichtsignals bei der Passage durch eine Thrombozytensuspension. Die in vitro Aggregation der Thrombozyten nach Zugabe eines Agonisten führt dabei zur Zunahme der Lichttransmission durch die Zellsuspension. Das durch Zentrifugation gewonnene PRP wurde durch Verdünnung mit autologem PPP auf eine Endkonzentration von 250.000 / μ l eingestellt. Die Zellkonzentrationen in den Proben wurden mit einem STKS-Blutbildanalysegerät (Beckman Coulter) bestimmt. Für die Messungen wurde die Messkammer des Aggregometers auf 37°C erwärmt, und die Lichttransmission durch Messkammer wurde mit PRP (0% optische Transmission) und PPP (100% optische Transmission) kalibriert. Durch die Zugabe von ADP [1,0 und 5,0 μ mol/l] TRAP-6 [20,0 μ mol/l] wurde die für den jeweiligen Agonisten halbmaximale [ADP 1,0] und maximale [ADP 5,0 / TRAP 20,0] Amplitude der Thrombozytenaggregation erzielt. Die Titrierung der eingesetzten Endkonzentrationen für beide Agonisten erfolgte in einem Vorversuch. Das Ausmaß der Aggregation wurde als prozentuale Änderung der Lichttransmission gegenüber dem PRP ausgedrückt. Analysiert wurden die maximale

Amplitude und der maximale Gradient der Aggregation sowie das Auftreten spontaner Desaggregationen (Zunahme der Transmission) innerhalb eines fünfminütigen Messintervalls. Die maximale Amplitude der Aggregation (max. Aggregation) ist als Prozentsatz der Lichttransmission im Verhältnis zum PRP und PPP angegeben (Abbildung 12). Der Mittelwert der als Doppelansatz durchgeführten Aggregationsmessungen wurde für die weiteren Auswertungen verwendet.

Abbildung 12: Schematische Darstellung einer Aggregationskurve



Maximale Aggregation: Differenz der Transmission zwischen der Nulllinie und der maximal erreichten Extinktionsabnahme nach Zugabe des Agonisten (in Prozent angegeben).

Aggregationsgradient: Winkel α zwischen der Nulllinie und Tangente am Wendepunkt der Aggregationskurve.

4.7 Weitere Laboranalysen

Die Blutbildanalyse inklusive Differentialblutbild, Thrombozytenzahl und mittlerem Thrombozytenvolumen erfolgte in EDTA-antikoagulierte Vollblut an einem STKS-Blutbildanalysegerät (Beckman Coulter), welches die zellulären Blutbestandteile nach dem Impedanzprinzip analysiert. Die Plasmafibrinogenkonzentration wurde nach der Claus-Methode an einem BCS-Coagulometer mit Hilfe des Thrombin Reagenz (Dade Behring, Marburg) gemessen. Zur Analyse der plasmatischen Gerinnung wurden die partielle Thromboplastinzeit mit dem Pathrothin SL Reagenz (Dade Behring) und die Thromboplastinzeit nach Quick mit dem Thromborel S Reagenz (Dade Behring) bestimmt. Weitere laborchemische Analysen, die im Rahmen der klinischen Laborroutine durchgeführt wurden, umfassten die Bestimmung der Kreatininkonzentration, der Harnsäurekonzentration, der Laktatdehydrogenase, der Creatin-Kinase, der Antithrombin-III Aktivität und des Lipidstatus (Gesamtcholesterin, HDL und LDL). Die Blutbildanalysen wurden in der Abteilung für Hämatologie, alle weiteren Laboranalysen wurden in der Abteilung für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik des Universitätsklinikums Essen nach entsprechenden Standardverfahren durchgeführt.

4.8 Datenauswertung und Statistik

Die Datenauswertung und alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS-Software Paket (Version 9.0) und die graphischen Ergebnisdarstellungen wurden mit dem Programm SigmaPlot (Version 4.0) durchgeführt.

Die kontinuierlichen Variablen wurden mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Die Darstellung der normalverteilten Variablen erfolgte als Mittelwert und Standardabweichung (Tabellen) bzw. als Standardfehler des Mittelwerts (Grafiken). Die zelluläre Rezeptorexpression wird als Antikörperbindungskapazität bzw. Fluoreszenzintensität und die TLA-Bildung wird als Prozentsatz der Leukozyten mit gebundenen Thrombozyten dargestellt.

Unterschiede der Rezeptorexpression, der TLA-Bildung sowie der Thrombozytenaggregation zwischen den definierten Zeitpunkten wurden mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA-Varianzanalyse und des Bonferroni Post-Hoc Tests auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht. Nicht normalverteilte Variablen wurden mit dem Wilcoxon-Test auf statistisch signifikante Unterschiede hin überprüft. Ein zweiseitiger P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Die kategorisch verteilten Variablen wurden mit Hilfe des Chi-Quadrat Tests sowie des exakten Tests nach Fisher auf ihre Signifikanz hin untersucht. Die Korrelationen zwischen den normalverteilten Variablen wurden mittels eines linearen Regressionsmodells durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient r der normalverteilten Variablen wurde nach Pearson berechnet.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

40 Patienten (33 Männer und 7 Frauen) mit stenosierender koronarer Herzerkrankung wurden untersucht. Keiner der Patienten hatte zum Zeitpunkt der Aufnahme einen akuten Myokardinfarkt oder zeigte das Bild einer instabilen Angina pectoris. Auch lag bei keinem Patienten eine höhergradige Herzinsuffizienz mit eingeschränkter linksventrikulärer Pumpfunktion vor. Die Tabellen 5 und 6 fassen das Patientenkollektiv hinsichtlich des Koronarstatus, der klinischen Beschwerdesymptomatik, des kardiovaskulären Risikoprofils sowie der Medikation zum Aufnahmezeitpunkt zusammen.

Tabelle 5: Patientencharakteristika bei stationärer Aufnahme

Variable	N (%) MW \pm Stdw.
N [Männer / Frauen]	33 (82,5) / 7 (17,5)
Alter	59,1 \pm 10,5
Kardiovaskuläre Risikofaktoren:	
Diabetes mellitus	10 (25,0)
Hypercholesterinämie	35 (87,5)
Nikotin	23 (57,5)
aktive Raucher	7 (17,5)
arterielle Hypertonie	27 (67,5)
Positive Familienanamnese	10 (33,3)
Koronarstatus:	
Koronare Eingefäßerkrankung	8 (20,0)
Koronare Zweigefäßerkrankung	12 (30,0)
Koronare Dreigefäßerkrankung	20 (50,0)
Myokardinfarkt (anamnestisch)	23 (57,5)
vorherige Bypassoperation	9 (22,5)
vorherige Koronarintervention(en)	27 (67,5)
Klinische Symptomatik *	
CCS I	10 (25,0)
CCS II	18 (45,0)
CCS III	12 (30,0)
CCS IV	0 (0)

CCS: Einteilung der pektanginösen Beschwerdesymptomatik entsprechend der Canadian Cardiovascular Society in vier Kategorien (I: keine Angina pectoris bei normaler körperlicher Belastung; II: geringe Beeinträchtigung der normalen körperlichen Aktivität durch Angina pectoris; III: Angina pectoris bereits bei leichter körperlicher Belastung; IV: Angina pectoris bei geringster körperlicher Belastung und in Ruhe).

Tabelle 6: Medikation der Patienten bei stationärer Aufnahme

Medikation	n (%)
ASS	40 (100)
Betablocker	32 (80,0)
Kalziumantagonisten	10 (25,0)
ACE-Hemmer	21 (52,5)
AT1-Antagonisten	4 (10,0)
Diuretika	5 (12,5)
Cholesterinsenker	34 (85,0)
Nitrate	18 (45,0)
Molsidomin	9 (13,3)
Orale Antidiabetika	5 (12,5)
Insulin	1 (2,5)
Digitalis	0 (0)

5.2 Behandlungsverlauf im untersuchten Patientenkollektiv

Die geplante Koronarintervention wurde bei der Mehrzahl der Fälle (65%) im Zeitintervall zwischen 24 und 72 Stunden nach Therapiebeginn durchgeführt. Bei zwei Patienten wurden der Eingriff kurz vor der 24 Std. Blutentnahme und bei 13 Patienten nach der 72 Std. Blutentnahme durchgeführt. 31 Patienten (77,5%) wiesen angiographisch eine oder mehrere Koronarstenosen auf, die interventionell behandelt werden konnten. Bei 6 (15%) Patienten zeigten sich angiographisch keine interventionsbedürftigen Koronarstenosen, während zwei Patienten aufgrund der Schwere der Erkrankung und ein Patient aufgrund eines zusätzlich bestehenden Aortenaneurysmas im weiteren stationären Verlauf mittels einer operativen Myokardrevaskularisation behandelt wurden.

Die Lokalisation der zu intervenierenden Stenose (Zielläsion) verteilte sich etwa gleichmäßig auf die drei großen epikardialen Gefäße. In vier Fällen wurde eine Stenose in einem aortokoronaren Bypass behandelt. Bei zwei Patienten wurden im Rahmen des Eingriffs Stenosen in zwei unterschiedlichen Gefäßen behandelt. 78% der behandelten Stenosen waren De-novo Stenosen, während in 22% eine Restenose interveniert wurde. In 5 Fälle wurde ein chronischer Gefäßverschluss rekanalisiert.

Im Rahmen der Koronarintervention wurden bei 24 Patienten einer oder mehrere (2-4) Stents implantiert. In den meisten Fällen erfolgte die Stentimplantation nach einer vorhergegangenen Ballondilatation. Diese führte bei sechs Patienten zur Ausbildung einer nicht-flusslimitierenden Gefäßdissektion. Fünf Patienten wurden bei Vorliegen einer Restenose mit alleiniger Ballonangioplastie ohne zusätzliche Stentimplantation behandelt. Zwei Patienten wurden mit PTCA und adjuvanter intrakoronarer Brachytherapie bei In-Stent Restenose behandelt (Tabelle 7). Die Koronarintervention zeigte bei allen Patienten ein gutes angiographisches Frühergebnis ohne Hinweise auf postinterventionelle Gefäßwanddissektionen oder Residualstenosen ($\geq 30\%$) im behandelten Zielgefäß. Akute

oder subakute ischämische Ereignisse nach der Koronarintervention wurden in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht beobachtet. Ein Patient wurde aufgrund einer schwierigen Intervention bei komplexer Stenosemorphologie periinterventionell prophylaktisch mit dem GP IIb/IIIa Antagonisten Abciximab behandelt. Da die Behandlung mit Abciximab die Thrombozytenaggregation und die Anti-körperbindung an den GP IIb/IIIa Rezeptor wesentlich beeinflusst, wurde dieser Patient post-interventionell von der Studie ausgeschlossen.

In der Mehrzahl der Fälle wurde die in der Arteria femoralis einliegende Schleuse direkt nach dem Eingriff gezogen und die Punktionsstelle mit den Angioseal™-Verschlussystem verschlossen. Bei keinem Patienten wurden postinterventionell schwere Blutungskomplikationen unter der anti-aggregatorischen Therapie beobachtet. Ein Patient musste jedoch aufgrund eines dislozierten und die Arteria femoralis okkludierenden Angioseal Verschlussankers gefäßchirurgisch behandelt werden.

Die Therapie mit Clopidogrel plus ASS wurde von den Patienten insgesamt gut vertragen. Zwei Patienten berichteten im Beobachtungszeitraum über Juckreiz und Hautrötungen, ein Patient berichtete über ein Übelkeitsgefühl unter der Therapie. Schwere Blutbildveränderungen (Neutropenien, Thrombozytopenien) unter Clopidogrel wurden in dem untersuchten Patientenkollektiv nicht beobachtet (siehe 5.7).

Tabelle 7: Stenoselokalisierung und -morphologie der Zielläsion und linksventrikulären Funktion

	N (%) / MW ± Stdw.
LVEF (%)*	63,2 ± 10,8
Lokalisation (Zielgefäß):	
RIVA	9 (29%)
RCX	10 (32%)
RCA	9 (29%)
Bypass	5 (16%)
Stenosetyp (Zielläsion)**	
Typ A	5 (16%)
Typ B [B1 / B2]	19 (61%) [14 / 5]
Typ C	9 (29%)
De novo Stenose	26 (78%)
(In-Stent) Restenose	7 (22%)
Stenosegrad (%) [#]	81,0 ± 14,7

* **LVEF**: Linksventrikuläre Ejektionsfraktion präinterventionell [(EDV-ESV / EDV) x 100]. ** Einteilung der behandelten Zielläsion entsprechend der angiographisch definierten Kriterien der American Heart Association in drei Gruppen.

[#] Angiographisch bestimmter maximaler Stenosegrades der Zielläsion (als Prozentsatz bezogen auf einen nicht-stenosierte Referenzabschnitt).

Tabelle 8: Peri- und postprozedurale Charakteristika der Koronarintervention

	N (%) / MW \pm Stdw.
Vordilatation vor Stentimplantation**	19 (79%)
Dissektion nach Dilatation*	6 (19%)
Stentimplantation**	24 (80%)
Einfache Stentimplantation*	13 (43%)
Mehrfache Stentimplantation*	11 (37%)
Stentlänge (mm)	17,5 \pm 5,1
Stent-/ Ballondurchmesser (mm)	3,3 \pm 0,5
Implantationsdruck (atm.)	14,8 \pm 2,5
Adjuvante Brachytherapie	2 (6,5%)
Dissektion (postinterventionell) #	0 (0%)
Residualstenose (\geq 30%) #	0 (0%)

* Prozentsatz bezogen auf alle interventionell behandelten Patienten. ** Prozentsatz bezogen auf die Patienten, bei denen ein Stent implantiert wurde. # Nach Abschluss der Intervention.

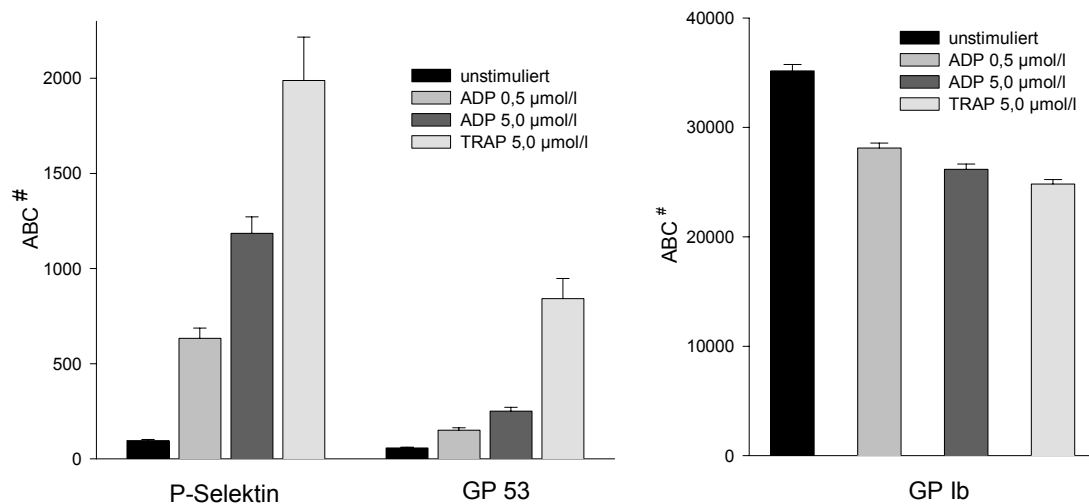
5.3 Thrombozytenrezeptorexpression und TLA-Bildung vor Therapiebeginn

Bei allen Patienten wurde vor Therapiebeginn die Expression thrombozytärer Membranrezeptoren und die TLA-Bildung in unstimulierten Vollblutproben und nach in vitro Stimulation mit ADP [0,5 und 5,0 μ mol/l] und TRAP-6 [5,0 μ mol/l] analysiert. Während die Expression von P-Selektin auf der Zelloberfläche unstimulierter Thrombozyten gering war (im Mittel ca. 100 pro Zelle), stieg sie nach in vitro Stimulation mit ADP auf im Mittel 650 [ADP 0,5] bzw. 1.200 [ADP 5,0] pro Zelle an. Unter höheren ADP-Konzentrationen ließ sich die Rezeptorexpression nicht weiter steigern (nicht dargestellt). Die Inkubation der Zellen mit TRAP-6, welches einen stärkeren Agonisten für die Zelle darstellt, führte gegenüber ADP zu einem weiteren Anstieg der Rezeptorexpression auf etwa 2.000 pro Zelle (Abbildung 13). Ähnliches wurde für den lysosomalen Membranrezeptor GP 53 beobachtet, dessen Expression im ruhenden Zustand und nach Stimulation gegenüber P-Selektin relativ und absolut gesehen geringer ausgeprägt war.

Im Gegensatz zu P-Selektin und GP 53 führte die Stimulation mit ADP und TRAP konzentrationsabhängig zu einer Abnahme der Expression des GP Ib Rezeptors auf der Zelloberfläche. Während auf der Oberfläche unstimulierter Thrombozyten etwa 35.000 GP Ib Rezeptoren exprimiert waren, sank die Zahl nach ADP-Stimulation auf 28.100 [ADP 0,5] bzw. 26.100 [ADP 5,0] pro Zelle. Die TRAP-Stimulation führte im Vergleich zu ADP zu einer verstärkten Abnahme der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche (Abbildung 13).

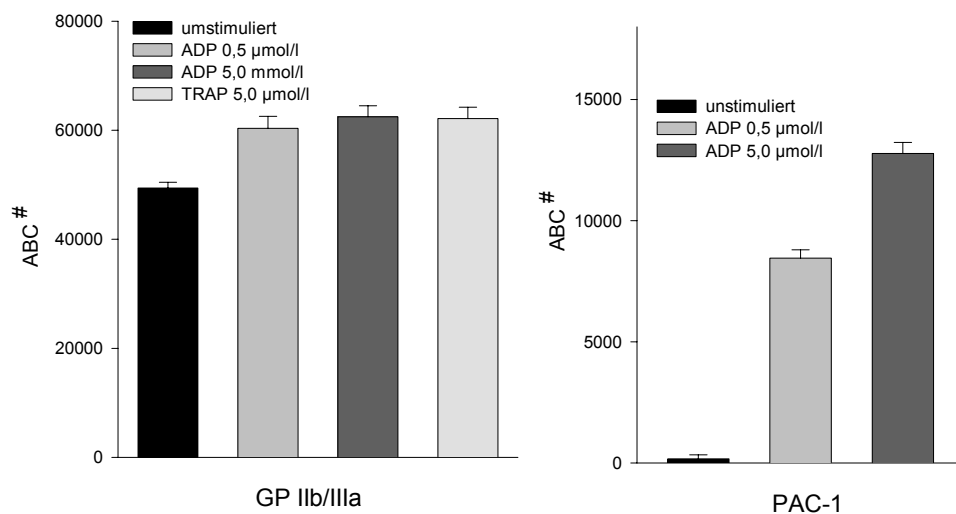
Die Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors (CD 41) auf der Oberfläche unstimulierter Thrombozyten vor Therapiebeginn wurde mit ca. 50.000 Rezeptoren pro Zelle berechnet. Die in vitro Stimulation mit ADP und TRAP führte zu einer Rezeptorrekrutierung und einer Mehrexpression von 24% auf der Zelloberfläche (Abbildung 14). Das GP IIb/IIIa Rezeptorneoepitop PAC-1 wurde erst nach in vitro Stimulation der Zellen zu einem relevanten Anteil exprimiert (8.450 bzw. 12.700 pro Zelle). Da die PAC-1 Expression unter TRAP-Stimulation in den Voruntersuchungen sehr inkonstant war, wurde im Rahmen dieser Studie nur die ADP-induzierte Rezeptorexpression untersucht.

Abbildung 13: Expression der Membranrezeptoren P-Selektin, GP 53 und GP Ib



Expression der thrombozytären Membranrezeptoren P-Selektin (CD 62P), GP 53 (CD 63) und GP Ib (CD 42b) im unstimulierten Vollblut und nach in vitro Stimulation. N = 40, Mittelwert \pm SEM. # Antikörperbindungskapazität.

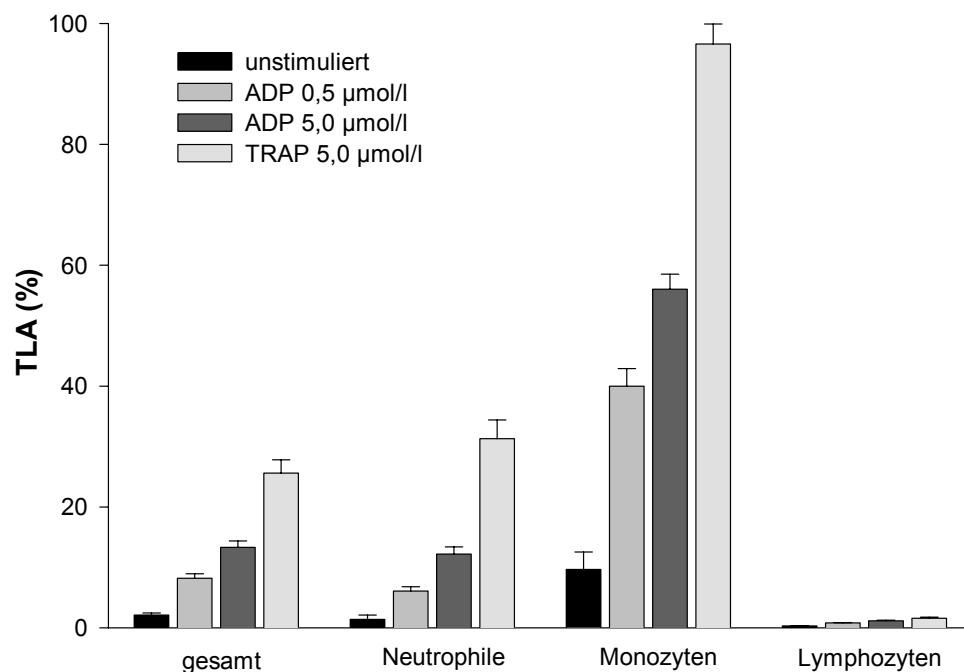
Abbildung 14: Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors und dessen Neoepitops PAC-1



Expression des GP IIb/IIIa Rezeptorkomplexes (CD 41) und des aktivierungsabhängigen Rezeptorneoepitops PAC-1 im unstimulierten Vollblut und nach in vitro Stimulation. N = 40, Mittelwert \pm SEM. # Antikörperbindungskapazität.

Die Analyse der TLA-Bildung vor Therapiebeginn zeigte, dass die Stimulation mit ADP und TRAP-6 zu einer vermehrten Thrombozytenadhäsion an Leukozyten führte. Gegenüber ADP war die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten unter TRAP deutlich verstärkt (25,6 % TLA [TRAP-6 5,0] vs. 13,3 % TLA [ADP 5,0]). Die Analyse der einzelnen Leukozytenpopulationen zeigte, dass eine Thrombozytenadhäsion vor allen an Neutrophile und Monozyten stattfand, während eine Adhäsion an Lymphozyten kaum beobachtet wurde. Besonders ausgeprägt war die Thrombozytenadhäsion an Monozyten, die nach ADP-Stimulation zu 56% und nach TRAP-Stimulation zu fast 70% Thrombozyten auf der Zelloberfläche gebunden hatten (Abbildung 15).

Abbildung 15: Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion nach in vitro Stimulation



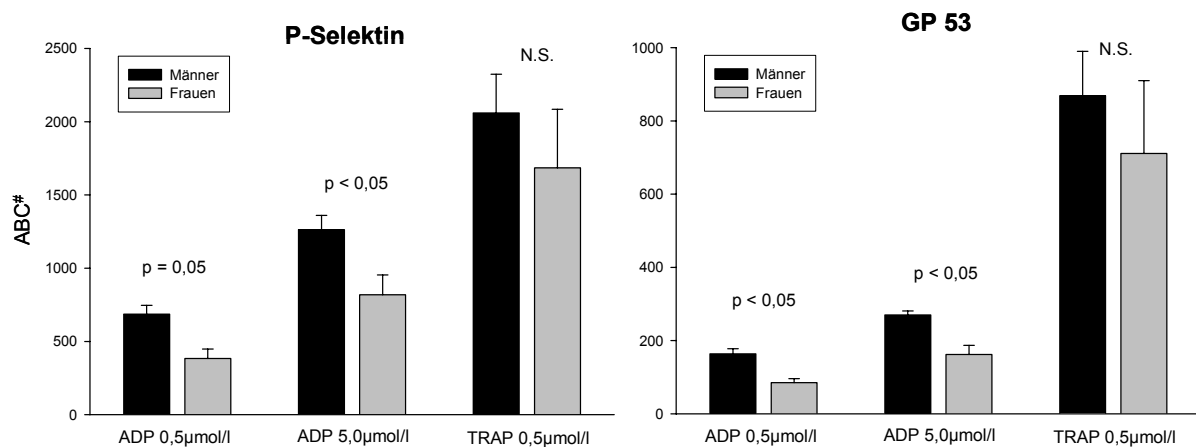
TLA: Prozentsatz der Adhäsion CD 41-positiver Thrombozyten an CD 45-positive Leukozyten (Neutrophile, Monozyten und Lymphozyten) nach in vitro Stimulation (ADP, TRAP-6). N = 40, Mittelwert \pm SEM.

5.4 Einflussgrößen der Rezeptorexpression und der TLA-Bildung

Im folgenden wurde untersucht, ob das Ausmaß der Expression thrombozytärer Membranrezeptoren, der TLA-Bildung und der Thrombozytenaggregation von bestimmten klinischen oder demographischen Patientenparametern abhängig ist. Die einfaktorielle Varianzanalyse zeigte, dass die Expression von P-Selektin und GP 53 unter ADP-Stimulation bei den Frauen signifikant niedriger lag (Abbildung 16). Die TRAP-induzierte Rezeptorexpression war bei geringer Fallzahl und einer relativ großen Variabilität der Messparameter in den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich. Ähnliches zeigte sich für die TLA-Expression und Expression von PAC-1. Ein Unterschied der ADP- und der TRAP-induzierten Thrombozytenaggregation bestand zwischen den beiden Gruppen nicht. Die

Thrombozytenzahl lag bei den Frauen in dem untersuchten Patientenkollektiv signifikant höher (267 ± 29 / nl vs. 206 ± 54 / nl; $p < 0,01$), das mittlere Thrombozytenvolumen unterschied sich hingegen nicht signifikant. Keinen Einfluss auf die Thrombozytenrezeptorexpression, die TLA-Bildung und die Aggregation hatten Alter, Größe und Gewicht / Body Mass Index der Patienten, der Koronarstatus, die klinische Beschwerdesymptomatik, kardiovaskuläre Risikofaktoren sowie die Medikation zu Studienbeginn. Der Einfluss des Thrombozytenaggregationshemmers ASS auf die Thrombozytenfunktion konnte nicht bestimmt werden, da alle Patienten bereits mit ASS 100mg/d vorbehandelt waren.

Abbildung 16: Expression von P-Selektin und GP 53 in Abhängigkeit vom Geschlecht



Vergleich der Expression von P-Selektin und GP 53 nach in vitro Stimulation in Abhängigkeit vom Geschlecht. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. $P < 0,05$ (ANOVA). # ABC: Antikörperbindungskapazität.

Einfluss des Blutbildes auf Rezeptorexpression und Aggregation

Die Erythrozyten- und Leukozytenzahl zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Expression thrombozytärer Membranrezeptoren und die Aggregation. Die Thrombozytenzahl wies eine negative Korrelation mit der Expression von PAC-1 (ADP 0,5: $r = -0,38$, $p < 0,05$; ADP 5,0: $r = -0,40$, $p < 0,05$) und der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation auf (ADP 1,0: $r = -0,49$, $p < 0,01$; ADP 5,0: $r = -0,34$, $p < 0,05$). Das mittlere Thrombozytenvolumen (MPV) korrelierte mit der Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors im unstimulierten Vollblut ($r = 0,64$, $p < 0,001$) wie auch unter ADP- und TRAP-Stimulation (ADP 0,5: $r = 0,75$, $p < 0,001$; ADP 5,0: $r = 0,74$, $p < 0,001$; TRAP: $r = 0,70$, $p < 0,001$). Auch die ADP-induzierte PAC-1 Expression (ADP 0,5: $r = -0,50$, $p < 0,01$; ADP 5,0: $r = -0,48$, $p < 0,01$) und die maximale Thrombozytenaggregation unter ADP korrelierten gering mit dem MPV (ADP 0,5: $r = -0,37$, $p < 0,05$; ADP 5,0: $r = -0,37$, $p < 0,05$). Die Expression des GP Ib Rezeptors unstimulierter Thrombozyten korrelierte ebenfalls gering mit dem MPV ($r = 0,43$, $p < 0,01$). Kein Zusammenhang zur Rezeptorexpression und Aggregation zeigte sich für die Serumlipidkonzentrationen (Cholesterin, HDL und LDL), das C-reaktive Protein und die plasmatischen Gerinnungstestes (aPTT, TPZ). Auch bestand

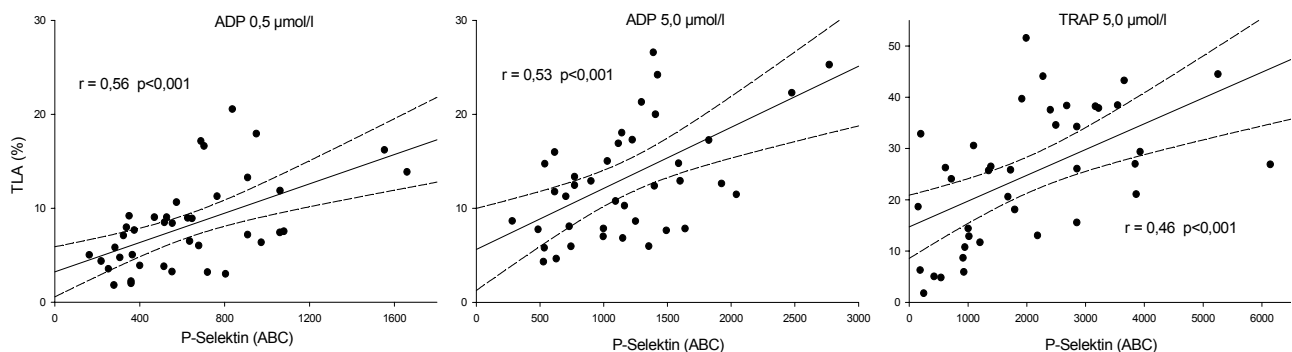
kein signifikanter Zusammenhang zwischen der Plasmafibrinogenkonzentration, der thrombozytären Fibrinogenbindung und der Thrombozytenaggregation.

Verhältnis zwischen thrombozytärer Rezeptorexpression, Aggregation und TLA

Die Analyse des Verhältnisses zwischen der Expression thrombozytärer Membranrezeptoren zur Thrombozytenaggregation und der TLA-Bildung zeigte, dass die Expression des als Ligand für die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten fungierenden P-Selektins signifikant mit der TLA-Bildung korrelierte (Abbildung 17). Die Analyse der Leukozytensubpopulationen zeigte, dass die Adhäsion an Neutrophile und Monozyten etwa gleich stark mit der Expression von P-Selektin korrelierten, während die Korrelation zwischen P-Selektin Expression und Adhäsion an Lymphozyten geringer ausgeprägt war. Die Expression der Rezeptoren GP Ib, GP 53 und GP IIb/IIIa wies keinen signifikanten Zusammenhang zur TLA-Bildung auf.

Die Analyse der thrombozytären Rezeptorexpression zeigte, dass die ADP- und die TRAP-induzierte Expression der beiden intrazellulär gespeicherten Membranrezeptoren P-Selektin und GP 53 deutlich miteinander korrelierte (ADP 0,5: $r=0,60$, $p<0,001$; ADP 5,0: $r=0,66$, $p<0,001$; TRAP: $r=0,88$, $p<0,001$). Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation zeigte eine schwache Korrelation mit der Expression von PAC-1 (ADP 0,5: $r=0,36$, $p<0,05$; ADP 5,0: $r=0,38$, $p<0,05$) sowie der Expression des GP IIb/IIIa Rezeptors. Die Expression der übrigen Oberflächenrezeptoren war nicht signifikant mit dem Ausmaß der Aggregation assoziiert.

Abbildung 17: Verhältnis zwischen P-Selektin Expression und TLA-Bildung

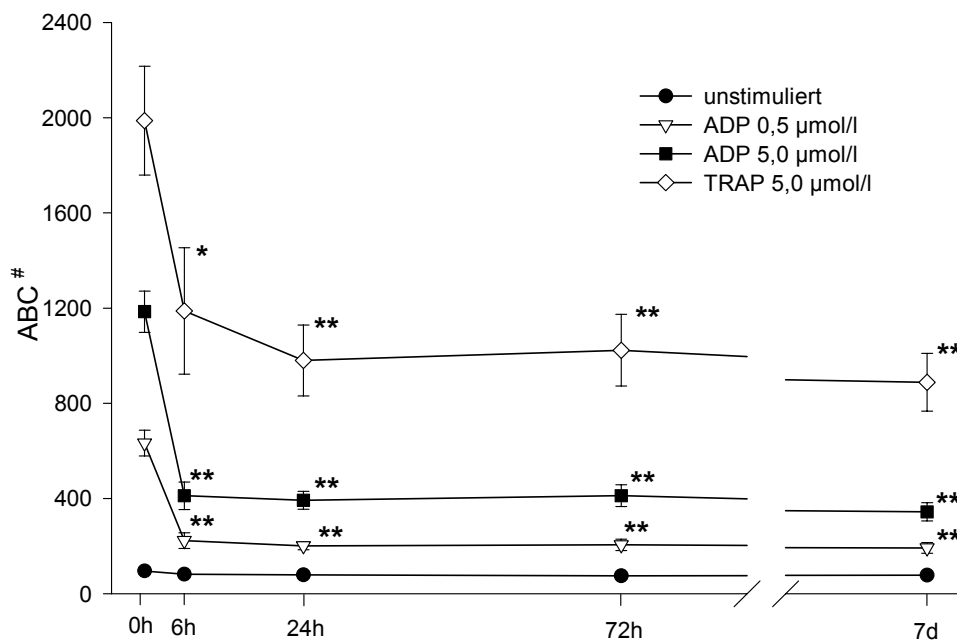


Korrelation zwischen P-Selektin Expression und TLA-Bildung nach ADP- und TRAP-Stimulation. Lineare Regression mit Darstellung der Regressionsgeraden und den 95% Konfidenzintervallen. Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitiges Signifikanzniveau).

5.5 Thrombozytenrezeptorexpression und TLA-Bildung unter Clopidogrel

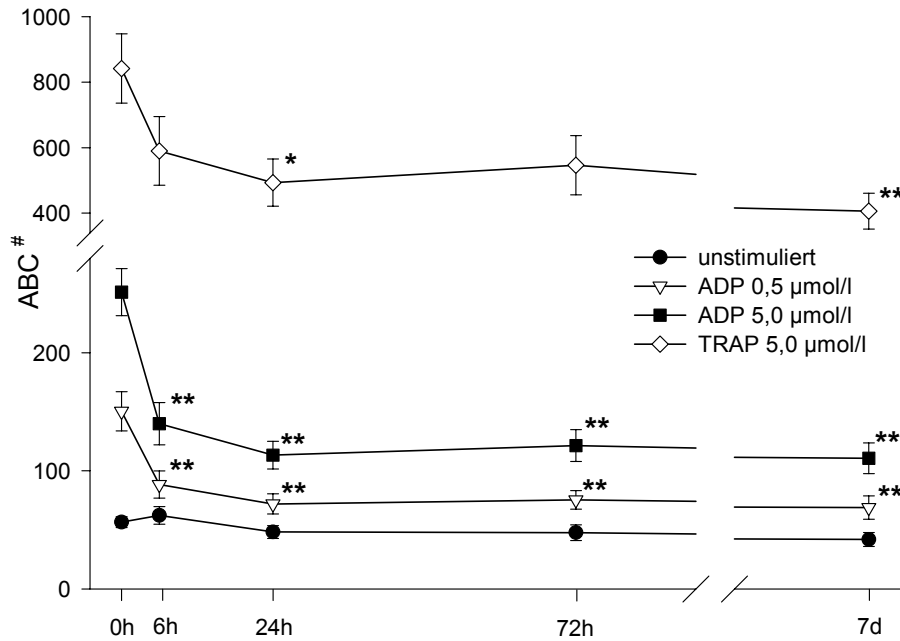
Die Expression der thrombozytären Membranrezeptoren und der TLA-Bildung wurden vor (0h) und zu vier Zeitpunkten (6h, 24h, 72h und 7d) nach Therapiebeginn mit Clopidogrel bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass Clopidogrel zu einer signifikanten Hemmung der ADP- und TRAP-induzierten Expression der intrazellulär gespeicherten Membranrezeptoren P-Selektin und GP 53 führte. Bereits 6 Stunden nach Therapiebeginn konnte eine fast maximale Hemmung der Rezeptorexpression verzeichnet werden (Abbildung 18 / 19). Nach 24 Stunden war ein stabiles Niveau der Expressionshemmung erreicht, welches durch die Erhaltungsdosis aufrecht gehalten wurde. Ein signifikanter Anstieg der Rezeptorexpression nach der Koronarintervention wurde nicht beobachtet. Während die Hemmung der TRAP-induzierten Expression beider Rezeptoren absolut gesehen stärker ausgeprägt war, wurde die ADP-induzierte Rezeptorexpression relativ gesehen stärker gehemmt (P-Selektin: -68% / -67% [ADP 0,5 / 5,0] vs. -49% [TRAP], GP 53: -52% / -55% [ADP 0,5 / 5,0] vs. -41% [TRAP]). Auch wies die Hemmung der TRAP-induzierten Rezeptorexpression im Vergleich zu ADP eine größere Streubreite auf. Die Expression von P-Selektin und GP 53 in den unstimulierten Vollblutproben änderte sich während des Beobachtungszeitraums nicht signifikant.

Abbildung 18: Expression von P-Selektin unter Clopidogrel



N = 40. Mittelwert \pm SEM, # Antikörperbindungskapazität. Rezeptorexpression vor bzw. zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test).

Abbildung 19: Expression von GP 53 unter Clopidogrel



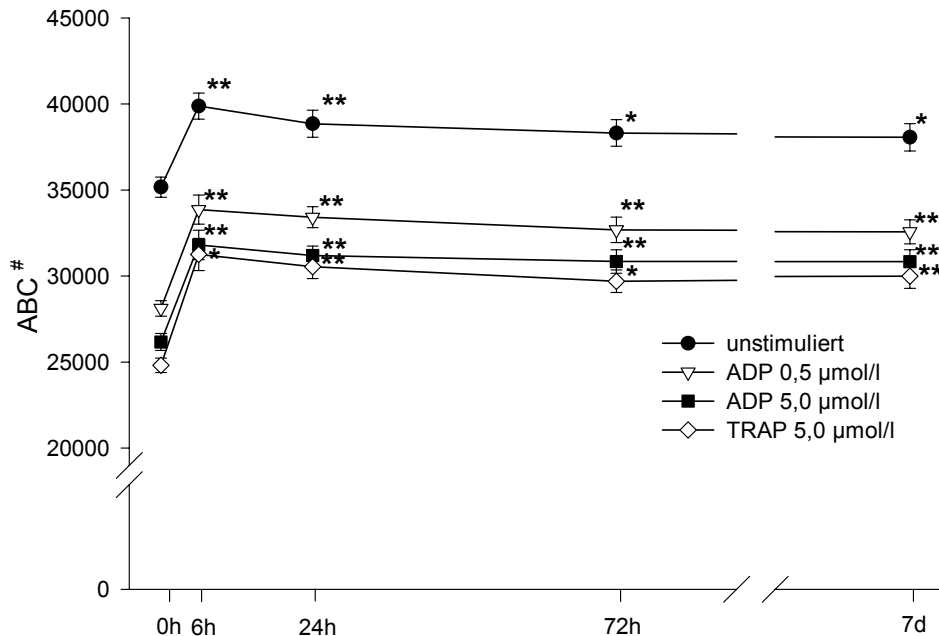
N = 40. Mittelwert \pm SEM, # Antikörperbindungskapazität. Rezeptorexpression vor bzw. zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test).

Unter der Clopidogrel-Therapie wurde ein signifikanter Anstieg der Expression des konstitutiven Oberflächenrezeptor GP Ib beobachtet. Dies betraf im Gegensatz zu P-Selektin und GP 53 nicht nur die Expression unter Stimulation mit ADP und TRAP, sondern auch die Rezeptorexpression in den unstimulierten Proben. Auch hier konnte bereits nach 6 Stunden nach Therapiebeginn ein fast maximaler Effekt beobachtet werden, der sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant änderte (Abbildung 20). Das Ausmaß der Rezeptorexpression unter Clopidogrel war für die Agonisten ADP und TRAP-6 absolut und relativ gesehen etwa gleich stark ausgeprägt (119% / 118% [ADP 0,5 / 5,0] vs. 123% [TRAP 5,0]). Eine signifikante Änderung der Rezeptorexpression nach der Koronar-intervention wurde nicht beobachtet.

Die Gesamtexpression des GP IIb/IIIa Rezeptors änderte sich absolut gesehen nicht-signifikant unter der Clopidogrel-Therapie. Die Rezeptorexpression in den unstimulierten Proben betrug vor und nach Therapiebeginn etwa 50.000 / Zelle. Die Rezeptorexpression unter Stimulation mit ADP und TRAP nahm unter der Therapie gering, jedoch nicht signifikant ab (Abbildung 21). Betrachtet man hingegen die prozentuale Rekrutierung von GP IIb/IIIa Rezeptoren auf der Zelloberfläche, so zeigte sich eine signifikante Hemmung der ADP- und TRAP-induzierten Rezeptorrekrutierung unter Clopidogrel, die für ADP insgesamt gesehen stärker ausgeprägt war (Abbildung 22). Der hemmende Effekt auf die Rezeptorrekrutierung war bereits nach 6 Stunden zu beobachten und ändert sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant. Für das aktivierungsabhängige Neopepitop des GP IIb/IIIa Rezeptors (PAC-1) wurde ebenfalls 6 Std. nach Therapiebeginn eine signifikante Hemmung der ADP-induzierten

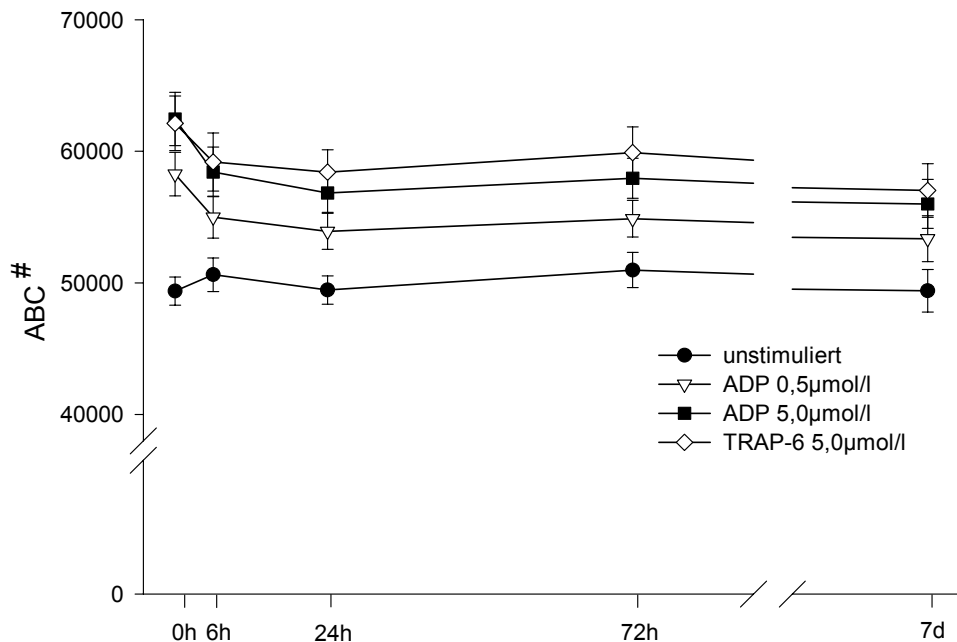
Rezeptorexpression verzeichnet (ADP 0,5: -69 %, ADP 5,0: -59 %). Das Ausmaß der Hemmung blieb unter der Therapie erhalten und stieg postinterventionell nicht signifikant an. Die Expression von PAC-1 in den unstimulierten Proben war unter Clopidogrel gering, jedoch signifikant vermindert (Abbildung 23).

Abbildung 20: Expression des GP Ib Rezeptors unter Clopidogrel



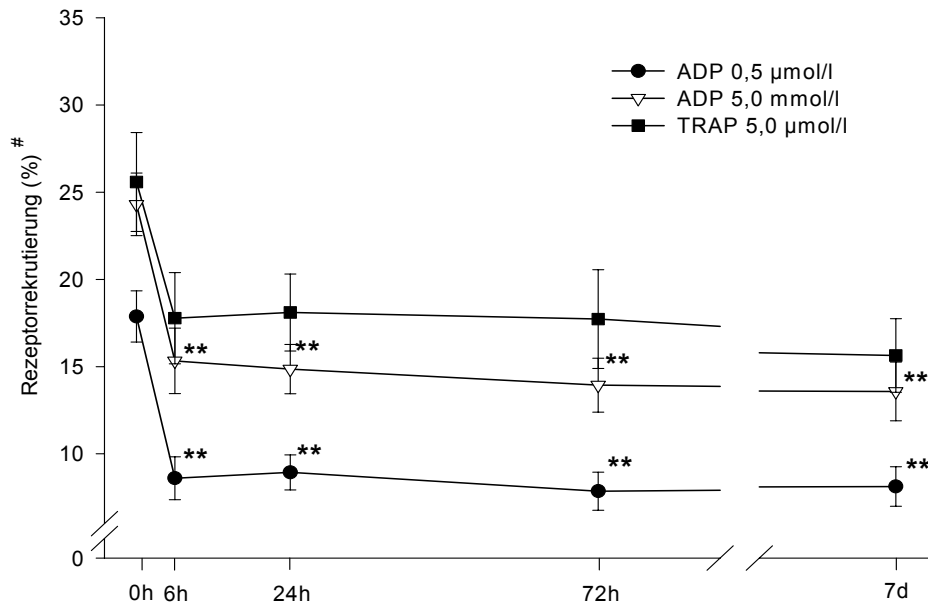
Rezeptorexpression vor bzw. zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Mittelwert \pm SEM. N = 40. #Antikörperbindungskapazität.

Abbildung 21: Gesamtexpression des GP IIb/IIIa Rezeptors unter Clopidogrel



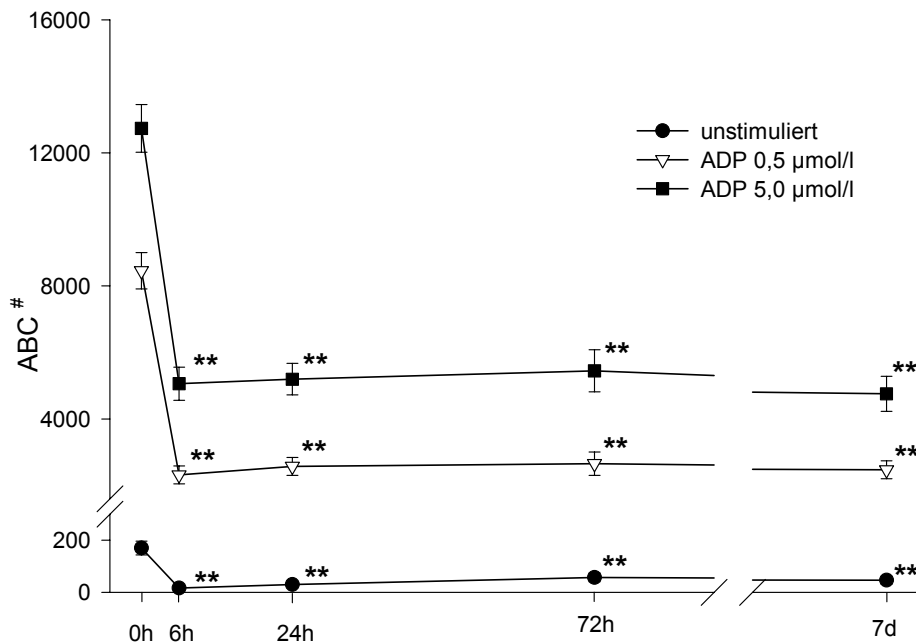
Rezeptorexpression vor bzw. zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn (ANOVA). N = 40. Mittelwert \pm SEM, #Antikörperbindungskapazität.

Abbildung 22: GP IIb/IIIa Rezeptorrekrutierung unter Clopidogrel



Rekrutierung von GP IIb/IIIa Rezeptoren unter in vitro Stimulation vor und zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post-Hoc Test). Mittelwert \pm SEM. N = 40. Berechnung der prozentualen Rekrutierung: (Expression stimuliert / Expression unstimuliert) \times 100 – 1

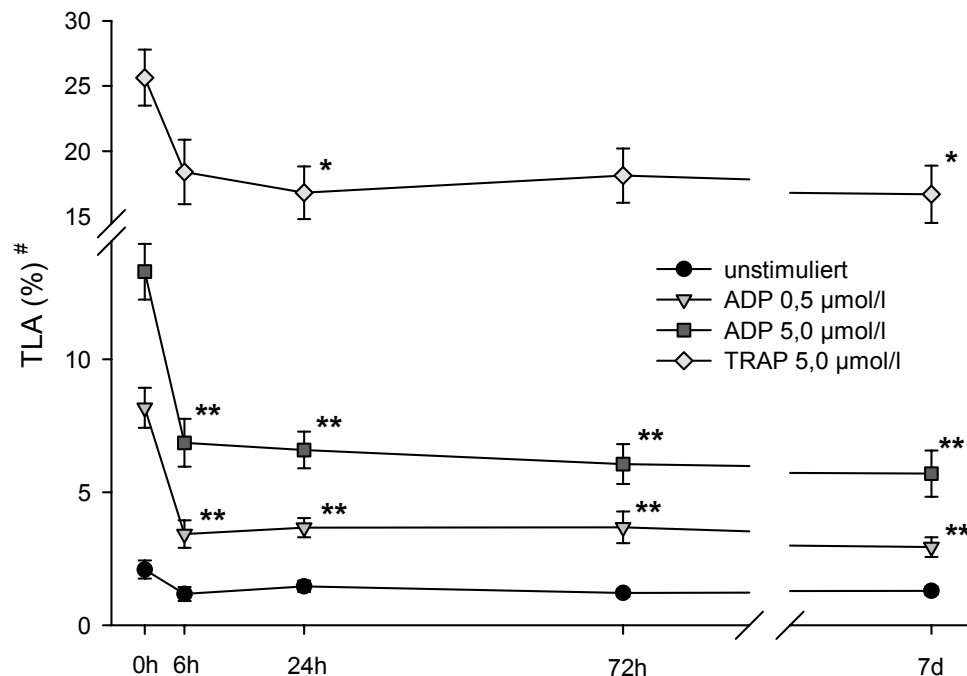
Abbildung 23: Expression des aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptors (PAC-1) unter Clopidogrel



Rezeptorexpression vor und zu vier definierten Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Mittelwert \pm SEM. N = 40. # Antikörperbindungskapazität.

Unter der Therapie mit Clopidogrel wurde auch die agonisten-induzierte Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten ebenfalls signifikant gehemmt. Das Ausmaß der ADP-induzierten TLA-Bildung war 6 Std. nach Therapiebeginn bereits um 59% [ADP 0,5] bzw. 48,5% [ADP 5,0] vermindert. Im weiteren Verlauf konnte eine geringe, jedoch nicht signifikante Abnahme der TLA-Bildung beobachtet werden. Ein signifikanter Anstieg der TLA-Bildung nach der Koronarintervention wurde nicht verzeichnet. Die TRAP-induzierte TLA-Bildung war unter Clopidogrel ebenfalls vermindert, wies jedoch eine relativ hohe Streubreite der Messwerte auf. Eine signifikante Hemmung der TLA-Bildung wurde nur zu zwei Zeitpunkten nach Therapiebeginn verzeichnet. Das Ausmaß der TLA-Bildung in den unstimulierten Vollblutproben war vor Therapiebeginn nur gering ausgeprägt und wurde durch die Therapie mit Clopidogrel nicht signifikant beeinflusst (Abbildung 24).

Abbildung 24: Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion unter Clopidogrel



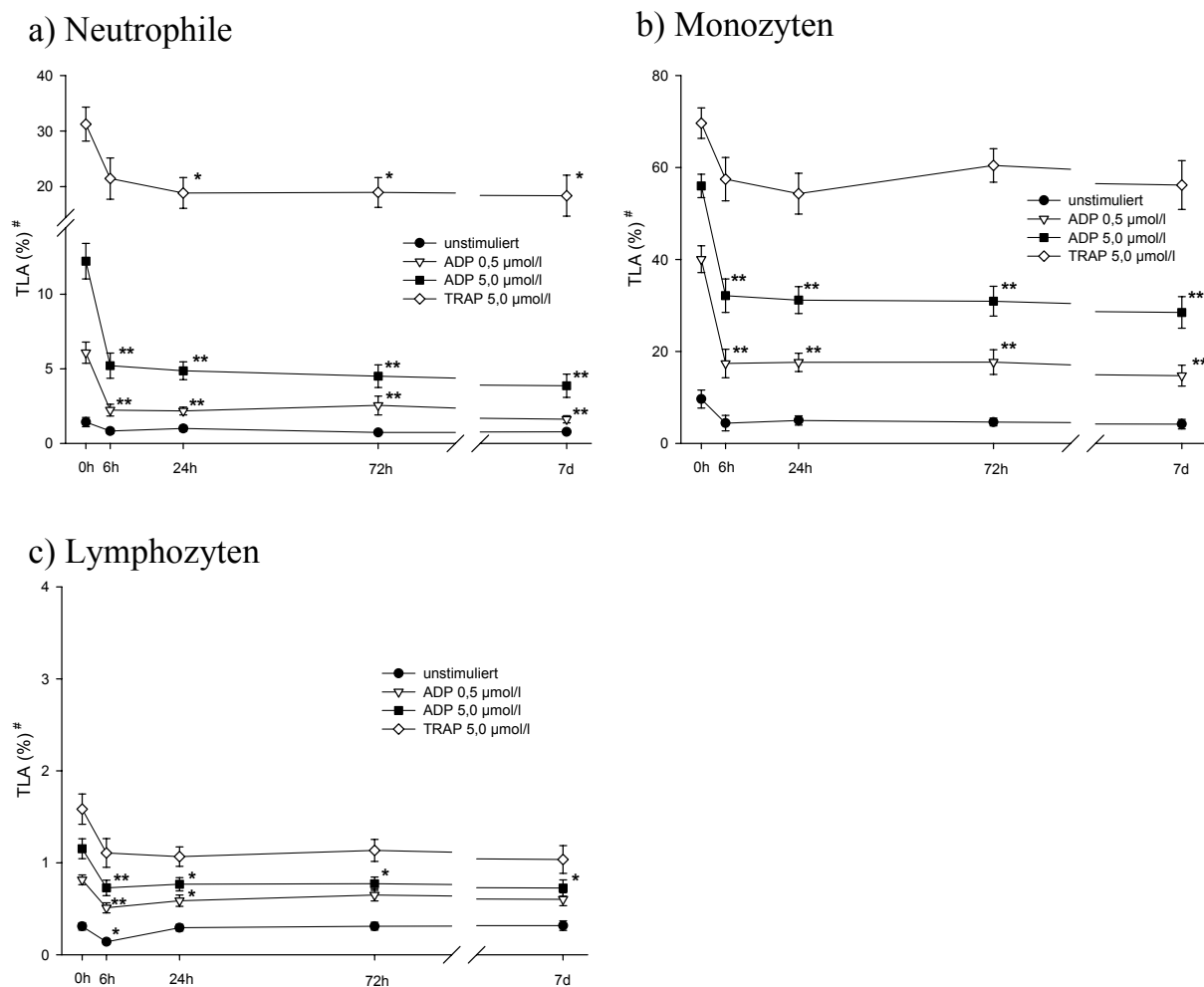
#Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion vor und zu vier definierten Zeitpunkten nach Therapiebeginn.

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Mittelwert \pm SEM. N = 40.

Die Analyse der einzelnen Leukozytenpopulationen vor Therapiebeginn zeigte, dass unter in vitro Stimulation eine Thrombozytenadhäsion insbesondere an Neutrophile und Monozyten stattfand, während die Adhäsion an Lymphozyten nur sehr schwach ausgeprägt war (Abbildung 15). Betrachtet man die TLA-Bildung unter der Therapie mit Clopidogrel, so zeigte sich für die Gruppe der Neutrophilen ein ähnliche Bild der Hemmung wie für die gesamte Leukozytenpopulation. Auch hier konnte bereits 6 Std. nach Therapiebeginn eine deutliche Hemmung der ADP-induzierten TLA-Bildung verzeichnet werden (ADP [0,5 / 5,0]: -63% / -57%). Das Ausmaß der Hemmung änderte sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant. Auch die TRAP-induzierte Adhäsion an Neutrophile war

unter der Therapie signifikant vermindert. Relativ betrachtet war die Hemmung der TRAP-induzierten TLA-Bildung jedoch geringer ausgeprägt als unter ADP und wies eine höhere Streubreite der Messwerte auf (Abbildung 25a). Die Thrombozytenadhäsion an Monozyten, die vor Therapiebeginn relativ gesehen am stärksten ausgeprägt war, wurde ebenfalls durch Clopidogrel signifikant gehemmt. Auch hier zeigte sich nach 6 Stunden bereits eine deutliche Hemmung der ADP-induzierten Adhäsion (ADP [0,5 / 5,0]: -56% / -43%), die im weiteren Verlauf erhalten bleibt und sich nicht signifikant änderte. Die Hemmung der TRAP-induzierten Adhäsion war relativ betrachtet geringer ausgeprägt und erreichte bei größerer Streubreite kein Signifikanzniveau (Abbildung 25b). Die Adhäsion an Lymphozyten, die im Vergleich zu Neutrophilen und Monozyten vor Therapiebeginn deutlich geringer ausgeprägt war, war unter Clopidogrel ebenfalls signifikant vermindert (Abbildung 25c)

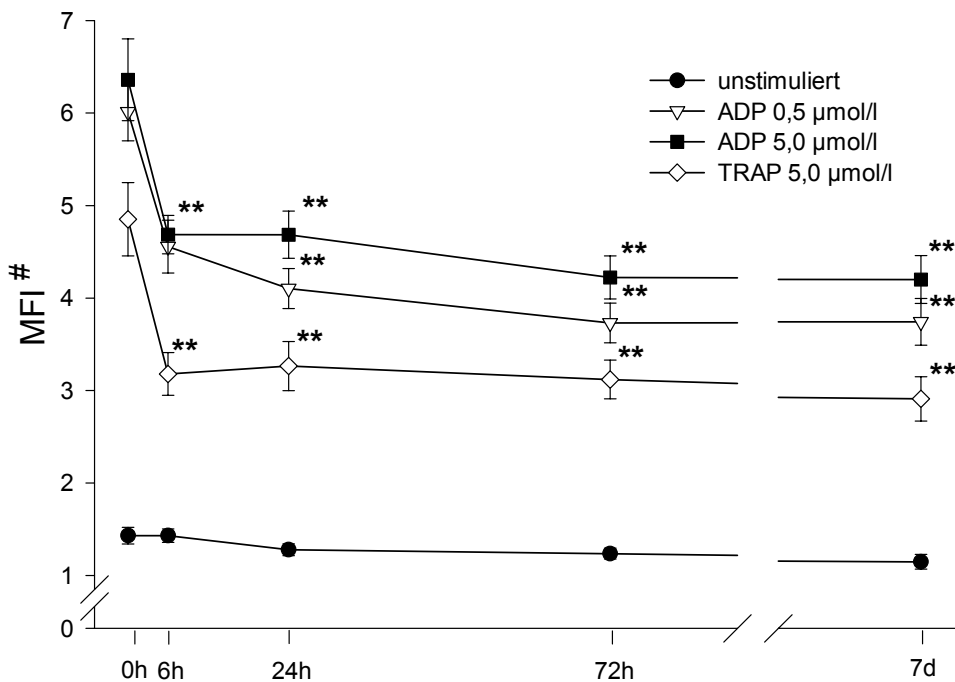
Abbildung 25: TLA-Bildung in den einzelnen Leukozytenpopulationen unter Clopidogrel



#Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion in den einzelnen Leukozytenpopulationen vor und zu vier Zeitpunkten nach Therapiebeginn. * p<0,05; ** p<0,01 (ANOVA, Bonferroni Post Hoc Test). Mittelwert ± SEM. N = 40.

Die thrombozytäre Fibrinogenbindung wurde ebenfalls rasch und signifikant durch Clopidogrel gehemmt. Dies betraf sowohl die ADP- wie auch die TRAP-induzierte Fibrinogenbindung auf der Zelloberfläche. Bereits 6 Std. nach Therapiebeginn war die Fibrinogenbindung gegenüber den Ausgangswerten signifikant vermindert. Im weiteren Verlauf war eine geringe, jedoch nicht signifikante Abnahme zu beobachten (Abbildung 26). Ein Anstieg der Fibrinogenbindung nach der Koronarintervention wurde nicht beobachtet. Die Verminderung der Fibrinogenbindung war für ADP und TRAP etwa gleich stark ausgeprägt. Die Fibrinogenbindung in den unstimulierten Proben wurde durch die Therapie nicht signifikant beeinflusst

Abbildung 26: Thrombozytäre Fibrinogenbindung unter Clopidogrel



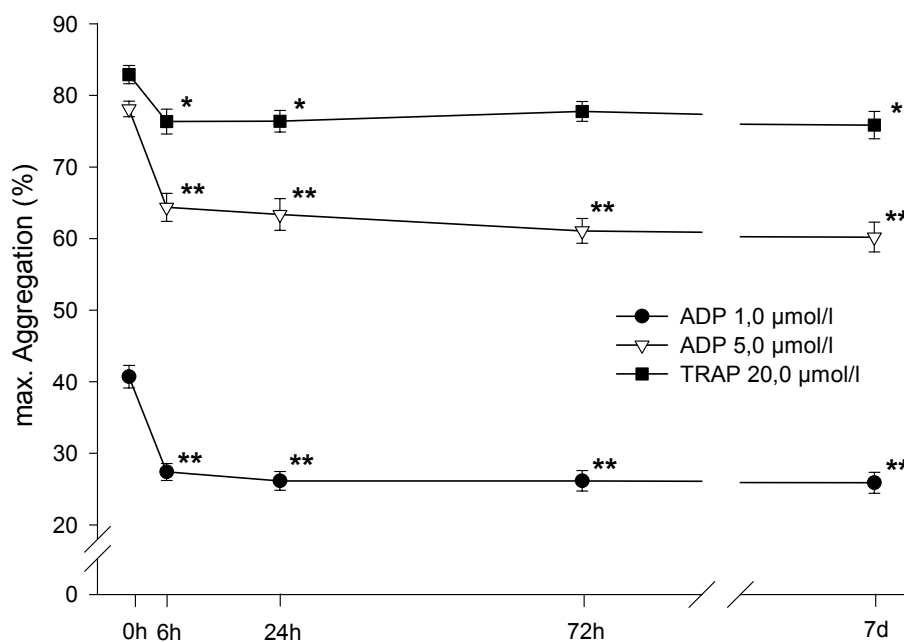
Thrombozytäre Fibrinogenbindung vor und zu den definierten Zeitpunkten nach Therapiebeginn. Mittelwert \pm SEM. N = 40. # MFI: mittlere Fluoreszenzintensität der gebundenen Antikörper. ** p<0,01 (ANOVA, Bonferroni).

5.6 Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel

Die im PRP gemessene ADP- sowie TRAP-induzierte Thrombozytenaggregation war bereits 6 Std. nach Therapiebeginn signifikant gehemmt. Dies betraf insbesondere die ADP-induzierte Aggregation, die um 33% [ADP 1,0] bzw. um 18% [ADP 5,0] gehemmt wurde. Im weiteren Verlauf stieg das Ausmaß der Aggregationshemmung auf 36,5% [ADP 1,0] bzw. 27% [ADP 5,0] an (Abbildung 27). Auch die TRAP-induzierte Aggregation war unter Clopidogrel signifikant vermindert, im Vergleich zu ADP war sie jedoch geringer ausgeprägt (8% Hemmung nach 6 Std.; 8,5% nach 7 Tagen). Auch der maximale Gradient der Aggregation wurde durch Clopidogrel gehemmt, dieser Effekt war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als die Hemmung der maximalen Aggregation. Lediglich unter geringer

ADP-Konzentration zeigte sich eine signifikante Minderung des maximalen Aggregationsgradienten nach Therapiebeginn. Unter der hohen ADP-Konzentration wurde eine signifikante Hemmung nach 72 Std. bzw. 7 Tagen beobachtet, während der maximale Gradient unter TRAP durch Clopidogrel nicht signifikant beeinflusst wurde (Abbildung 28). Ein signifikanter Anstieg der ADP- oder TRAP-induzierten Aggregation zu Messzeitpunkten nach der Koronarintervention wurde nicht beobachtet. Betrachtet man das Auftreten spontaner Desaggregationen im fünfminütigen Messintervall nach in vitro Stimulation, so trat diese unter der Therapie mit Clopidogrel signifikant häufiger auf. Während unter der geringen ADP-Konzentration [ADP 1,0] vor Therapiebeginn in 38% der Fälle eine Desaggregation beobachtet wurde, stieg der Anteil unter der Clopidogrel-Therapie auf über 75% an. Vor Therapiebeginn wurde unter der hohen ADP-Konzentration und unter TRAP keine Desaggregationen beobachtet. Unter der Therapie mit Clopidogrel hingegen wurde bei 30-38% [ADP 5,0] bzw. 19-25% [TRAP] der Patienten eine Desaggregation nach in vitro Stimulation beobachtet (Abbildung 29).

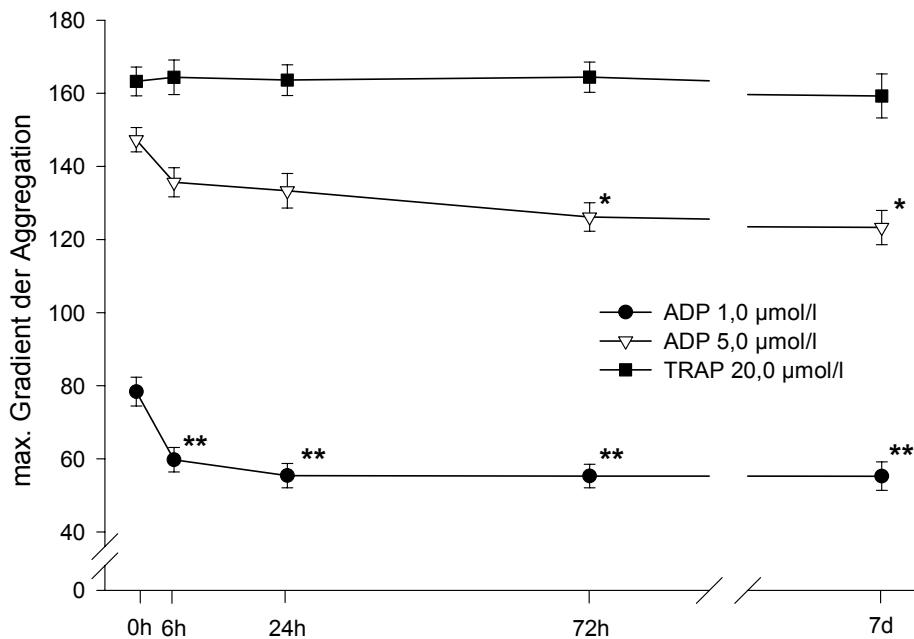
Abbildung 27: Maximale Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel



Maximale Thrombozytenaggregation (%) im plättchenreichen Plasma (250.000/ µl) nach in vitro Stimulation mit ADP und TRAP-6 unter der Therapie mit Clopidogrel.

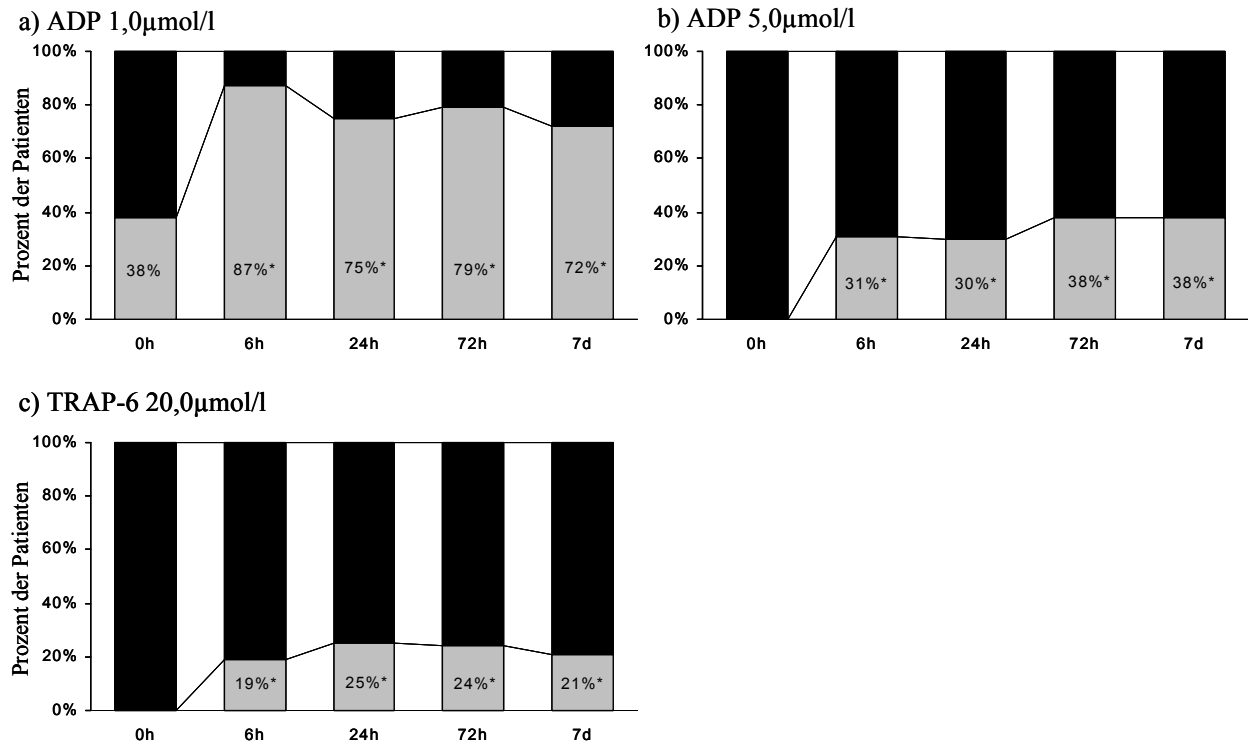
Mittelwert ± SEM. N= 40. * p<0,05; ** p<0,01 (ANOVA, Bonferroni Post-Hoc Test).

Abbildung 28: Maximaler Gradient der Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel



Maximaler Gradient der Thrombozytenaggregation nach in vitro Stimulation mit ADP und TRAP-6 unter der Clopidogrel. Mittelwert \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (ANOVA).

Abbildung 29: Spontane Desaggregation nach in vitro Stimulation unter Clopidogrel



Spontane Desaggregation nach in vitro Stimulation mit ADP und TRAP-6 unter Clopidogrel. * $p < 0,05$ (Chi Quadrat Test).

5.7 Blutbildanalyse und plasmatische Gerinnung unter Clopidogrel

Zum Zeitpunkt des Therapiebeginns lag bei keinem Patienten eine Thrombozytopenie oder eine Störung der Leukozyten- und Erythrozytenzahlen vor. Die Blutbildanalyse im Therapieverlauf zeigte, dass die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokritwert und die Erythrozytenzahlen gegenüber dem Ausgangswert nach 72 Std. geringfügig, nach 7 Tagen jedoch signifikant vermindert waren (Tabelle 9). Der Hb-Abfall betrug im Mittel 1,1 g/dl gegenüber dem Ausgangswert. Bei vier Patienten wurde postinterventionell ein Hb-Abfall von mehr als 2,0 g/dl beobachtet. Keiner der Patienten benötigte jedoch eine Substitution in Form von Erythrozytenkonzentraten. Die Analyse der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messpunkten vor und nach Therapiebeginn. Die Leukozytenzahl stieg 72 Stunden nach Therapiebeginn gering gegenüber dem Ausgangswert an, fiel im weiteren Verlauf jedoch wieder ab und war nach 7 Tagen nicht mehr signifikant erhöht. Der Anteil der Neutrophilen, Monozyten und Lymphozyten im Differentialblutbild war im Beobachtungszeitraum nicht signifikant verändert.

Tabelle 9: Blutbildanalyse unter der Therapie mit Clopidogrel

	0 h	6 h	24 h	72 h	7 d
Hämoglobin (g/dl)	14,6 ± 1,0	14,0 ± 0,8	14,4 ± 0,8	13,9 ± 1,5	13,5 ± 1,5**
Hämatokrit (%)	42,1 ± 2,8	41,4 ± 2,8	41,8 ± 2,6	40,4 ± 4,0	39,8 ± 4,1**
Erythrozyten / μ l	4,64 ± 0,4	4,51 ± 0,3	4,61 ± 0,33	4,44 ± 0,5	4,25 ± 0,4**
Thrombozyten / nl	216 ± 57	218 ± 62	211 ± 64	218 ± 59	233 ± 66
MPV (fl)	8,25 ± 1,04	-	7,91 ± 0,72	8,22 ± 1,07	8,27 ± 0,90
Leukozyten / nl	7,55 ± 2,20	6,90 ± 1,60	6,57 ± 1,53	8,71 ± 3,30*	7,67 ± 2,01
Neutrophile (%)	60,7 ± 9,7	-	58,0 ± 7,6	62,0 ± 9,1	60,8 ± 7,7
Monozyten (%)	9,02 ± 2,7	-	9,32 ± 2,1	8,60 ± 2,6	8,92 ± 2,1
Lymphozyten (%)	26,8 ± 8,2	-	28,6 ± 6,3	26,4 ± 8,9	26,1 ± 8,0

Ergebnisdarstellung als Mittelwert ± Standardabweichung. * p<0,05; ** p<0,01; # p<0,001 (ANOVA, Bonferroni Post-Hoc Test). MPV: mittleres Thrombozytenvolumen.

In den am Aufnahmetag durchgeführten Gerinnungstests wurde bei keinem Patienten eine Störung der plasmatischen Gerinnung (aPTT, TPZ), der AT-III Aktivität oder der Plasmafibrinogenkonzentration beobachtet. Die Analysen der aPTT und TPZ im Beobachtungszeitraum zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten (Tabelle 10). Auch die AT-III Aktivität war unter der Therapie nicht signifikant verändert. Die Plasmafibrinogenkonzentration änderte sich zunächst nicht, stieg postinterventionell (7 Tage) jedoch signifikant gegenüber dem Ausgangswert an. Auch das Akutphaseprotein CRP war nach 7 Tagen gering, jedoch signifikant gegenüber dem Ausgangswert

erhöht (Tabelle 11). Die Serumkonzentration des Kreatinins, der Harnsäure, der Laktatdehydrogenase und der Creatin-Kinase zeigten gegenüber dem Ausgangswert keine signifikanten Änderungen.

Tabelle 10: Plasmatischen Gerinnung und Plasmafibrinogenkonzentration unter Clopidogrel

	0 h	6 h	24 h	72 h	7 d
Fibrinogen (mg/dl)	342 ± 71	348 ± 89	336 ± 64	374 ± 107	448 ± 159 [#]
aPTT (sec.)	30,8 ± 2,4	-	30,6 ± 3,2	28,7 ± 1,8	30,6 ± 3,1
TPZ (%)	106,0 ± 12,5	-	103,4 ± 9,1	103,8 ± 7,9	105,4 ± 10,7
AT III (%)	110,2 ± 14,1	-	-	-	105,1 ± 18,1

Ergebnisdarstellung als Mittelwert ± Stdw. * p<0,05; ** p<0,01; # p<0,001 (ANOVA, Bonferroni Post-Hoc Test). aPTT: aktivierte partielle Thromboplastinzeit (in Sek.), TPZ: Thromboplastinzeit nach Quick, ATIII: Antithrombin III Aktivität.

Tabelle 11: Weiterer laborchemische Analysen

	0h	7d
Kreatinin (mg/dl)	0,81 ± 0,17	0,83 ± 0,24
Harnsäure (mg/dl)	5,8 ± 2,4	5,67 ± 2,1
CRP (mg/l)	0,28 [0,1-1,8]	0,55 [0,2-3,2]*
LDH (U/l)	189 ± 49,6	174 ± 38,3
CK (U/l)	58,0 ± 24,4	60,0 ± 31,4
Gesamtcholesterin (mg/dl)	185,6 ± 34,0	-
LDL (mg/dl)	125,7 ± 30,5	-
HDL (mg/dl)	42,0 ± 10,7	-

Darstellung als Mittelwert ± Stdw. bzw. Median [Min.-Max.], * p=0.01 (Wilcoxon-Test).

CRP: C-reaktives Protein; LDH: Laktatdehydrogenase; CK: Creatin-Kinase;

HDL: High Density Lipoprotein, LDL: Low Density Lipoprotein.

5.8 Einflussgrößen der Rezeptorexpression, TLA-Bildung und Aggregation

Die Expression der aktivierungsabhängigen thrombozytären Membranrezeptoren, die TLA-Bildung und die Thrombozytenaggregation wurde unter der Clopidogrel-Therapie im Mittel rasch und signifikant gehemmt. Im folgenden wurde untersucht, welche Faktoren das Ausmaß der Hemmung potentiell beeinflussen und welche Beziehungen die untersuchten Membranrezeptoren zueinander bzw. zur TLA-Bildung und zur Thrombozytenaggregation aufwiesen.

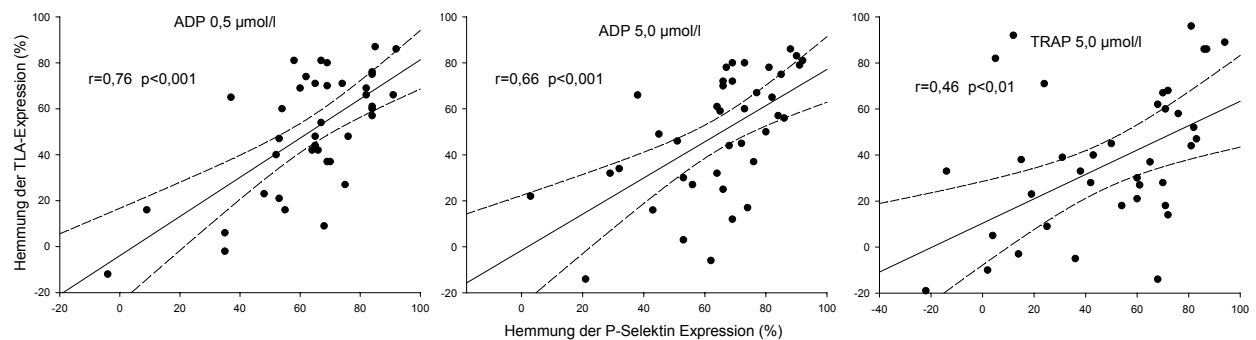
Bei nahezu allen Parametern wurde unter Clopidogrel nach 24 Std. ein fast maximaler Hemmeffekt beobachtet, der sich im weiteren Verlauf nicht mehr signifikant änderte. Für die Analyse potentieller Einflussgrößen wurde deshalb das Verhältnis des 24-Std. Wertes zum Ausgangswert zugrunde gelegt.

Es zeigte sich, dass die Hemmung der ADP-induzierten Expression von P-Selektin bei den Frauen tendenziell geringer ausgeprägt war (M: 65,9% vs. F: 43,0%, $p=0,02$ [ADP 0,5], M: 64,5% vs. F: 50,7%, $p=0,2$ [ADP 5,0]), was wahrscheinlich durch die vermehrte Rezeptorexpression bei Männern zu Therapiebeginn bedingt war. Auf die Hemmung der übrigen Membranrezeptoren und die Thrombozytenaggregation hatte das Geschlecht keinen signifikanten Einfluss. Der Koronarstatus der Patienten und die kardiovaskulären Risikofaktoren zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Hemmung der Rezeptorexpression unter Clopidogrel. Lediglich die Gruppe der Diabetiker wies eine tendenziell geringere Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation auf (DM: 38,1% vs. 23,8%, $p=0,035$ [ADP 1,0], DM: 20,9% vs. 11,9%, $p=0,15$ [ADP 5,0]). Alter, Größe und Gewicht der Patienten hatten keinen Einfluss auf die Hemmung der Rezeptorexpression und der Aggregation. Auch die Thrombozytenzahl, das MPV und die Fibrinogenkonzentration beeinflussten die Hemmung nicht signifikant. Insbesondere bestand kein Zusammenhang zwischen der Plasmafibrinogenkonzentration und der thrombozytären Fibrinogenbindung sowie zwischen der Thrombozytenzahl und der Hemmung der Thrombozytenaggregation unter Clopidogrel.

Betrachtet man das Verhältnis zwischen Aggregationshemmung und der Hemmung der Rezeptorexpression, zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Hemmung der ADP-induzierten Aggregation und der Hemmung der ADP-induzierten Rekrutierung des GP IIb/IIIa Rezeptors ($r=0,48$, $p<0,01$) sowie der ADP-induzierten Expression von PAC-1 ($r=0,51$, $p<0,001$). Daneben wurde ein Verhältnis zwischen der Aggregationshemmung und der Hemmung der Fibrinogenbindung beobachtet ($r=0,47$, $p<0,001$ [ADP 1,0 / 5,0], $r=0,49$, $p<0,001$ [ADP 5,0 / 5,0], $r=0,43$, $p<0,01$ [TRAP]). Die Hemmung der ADP-induzierten Expression von PAC-1 wies signifikante Korrelationen zur Hemmung der ADP-induzierten Rekrutierung des GP IIb/IIIa Rezeptors ($r=0,65$, $p<0,001$) und der Fibrinogenbindung auf ($r=0,50$, $p<0,01$).

Neben der Korrelation der Rezeptorexpression von P-Selektin und GP 53 vor Therapiebeginn zeigte sich auch bei der Hemmung der Rezeptorexpression ein deutlicher Zusammenhang zwischen beiden Membranrezeptoren ($r=0,59$, $p<0,001$ [ADP 0,5], $r=0,85$, $p<0,001$ [ADP 5,0], $r=0,76$, $p<0,001$ [TRAP]). Ähnliches wurde für den Zusammenhang zwischen der Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche und der TLA-Bildung beobachtet. Auch hier zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Hemmung der P-Selektin Expression und der Hemmung der TLA-Bildung (Abbildung 30).

Abbildung 30: Verhältnis zwischen der Hemmung der P-Selektin Expression und der Hemmung der TLA-Bildung unter Clopidogrel



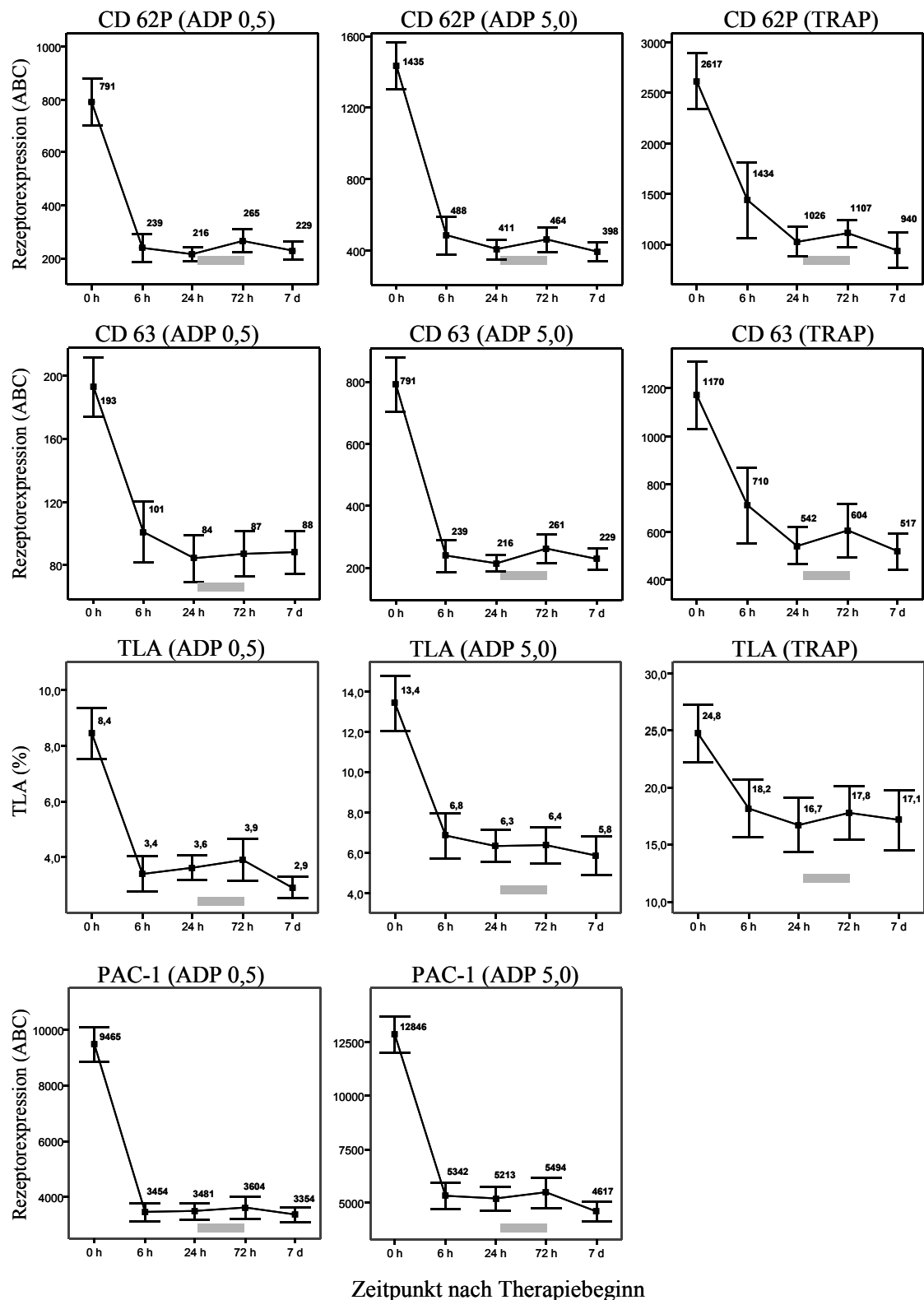
Korrelation zwischen der Hemmung der P-Selektin Expression und TLA-Expression unter Clopidogrel. Lineare Regression mit Darstellung der linearen Regressionsgeraden und den 95% Konfidenzintervallen. Korrelationskoeffizient nach Pearson (zweiseitiges Signifikanzniveau).

5.9 Einfluss der Intervention auf Rezeptorexpression, TLA-Bildung und Aggregation

Zur Beurteilung des Einflusses der Koronarintervention auf die Expression der thrombozytären Membranrezeptoren, der TLA-Bildung und der Aggregation wurde die Patientengruppe betrachtet, die zwischen den Messzeitpunkten 2 und 3 (24-72 Std.) interventionell behandelt wurde. In dieser Patientengruppe (N = 21) zeigte sich postinterventionell kein signifikanter Anstieg der ADP- und der TRAP-induzierten Expression von P-Selektin, GP 53 und PAC-1, der TLA-Bildung und der Thrombozytenaggregation (Abbildung 31). Auch in der Gruppe, die zwischen den Messzeitpunkten 4 und 5 (72h – 7d) interveniert wurde (N = 9), war postinterventionell kein Anstieg der Rezeptorexpression oder Aggregation zu beobachten (nicht dargestellt). Die Rezeptorexpression und die TLA-Bildung der Patienten, denen im Rahmen der Intervention ein Stent implantiert wurde, unterschied sich nicht signifikant von den Patienten, die mit alleiniger Ballonangioplastie behandelt wurden.

Postinterventionell wurde ein signifikanter Anstieg der Leukozytenzahl (24h: 6,82 / nl, 72h: 9,03 / nl, 7d: 7,85 / nl, p<0,01 [ANOVA]) und der Plasmafibrinogenkonzentration (24h: 343 mg/dl, 72h: 379 mg/dl, 7d: 460 mg/dl, p<0,01 [ANOVA]) beobachtet. Auch wurde postinterventionell ein signifikanter Abfall der Hämoglobinkonzentration beobachtet. Der Hb-Wert (Tag 7) der interventionell behandelten Patienten unterschied sich jedoch nicht signifikant von den Patienten, die nicht interventionell behandelt wurden (Interv: 13,5 g/dl, Koro: 12,9 g/dl, N.S.). Die Thrombozytenzahl, das MPV und das Differentialblutbild waren postinterventionell nicht signifikant unterschiedlich.

Abbildung 31: Einfluss der Koronarintervention auf die Thrombozytenrezeptorexpression und die TLA-Bildung unter Clopidogrel



Zeitintervall (24h-72h nach Therapiebeginn) in dem die Koronarintervention durchgeführt wurde.

Expression von P-Selektin, GP 53, PAC-1 und TLA-Bildung bei den Patienten, die 24-72 Std. nach Therapiebeginn interveniert wurden. Darstellung als Mittelwert \pm SEM. N = 21.

6 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war eine differenzierte Analyse der Thrombozytenfunktion und der Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die vor geplanter elektiver Koronarintervention mit dem Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel behandelt wurden.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigten, dass die Therapie mit Clopidogrel (300 mg Aufsättigungsdosis, 75 mg/d Erhaltungsdosis) zu einer raschen Hemmung der ADP- und TRAP-induzierten Expression der intrazellulär gespeicherten Membranrezeptoren P-Selektin und GP 53 führte. Während sich die Gesamtexpression des GP IIb/IIIa Rezeptors auf der Zelloberfläche nicht signifikant änderte, wurden die Rezeptorrekrutierung des GP IIb/IIIa Rezeptors und die Expression des aktivierungsabhängigen Neoepitops (PAC-1) durch Clopidogrel signifikant gehemmt. Auch die Fibrinogenbindung an die Thrombozytenoberfläche und die Thrombozytenaggregation waren unter der Therapie signifikant vermindert. Insbesondere die ADP-induzierte Rezeptorexpression und die ADP-induzierte Aggregation wurden deutlich gehemmt, jedoch war auch die durch TRAP-induzierte Zellaktivierung signifikant vermindert. Bereits 6 Stunden nach Therapiebeginn (300 mg Clopidogrel) konnte eine fast maximale Hemmung der Expression der aktivierungsabhängigen Membranrezeptoren und der Thrombozytenaggregation verzeichnet werden, deren Ausmaß im weiteren Therapieverlauf erhalten blieb. Postinterventionell waren die Expression der thrombozytären Membranrezeptoren und die Aggregation nicht signifikant erhöht. Neben der Hemmung der Thrombozytenrezeptorexpression und Aggregation war auch das Ausmaß der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion unter Clopidogrel deutlich gehemmt. Dies betraf insbesondere die ADP-induzierte Adhäsion der Thrombozyten an Neutrophile und Monozyten.

6.1 Koronarintervention und reaktive Thrombozytenaktivierung

Wie bereits unter Punkt 2.5 dargestellt, spielt die reaktive Aktivierung zirkulierender Thrombozyten, die durch eine Traumatisierung des Koronargefäßes bei Ballonangioplastien induziert wird, eine wichtige Rolle bei Ausbildung thrombotischer Gefäßverschlüsse. Experimentelle Untersuchungen und Analysen der Thrombozytenfunktion im Rahmen von Koronarinterventionen beim Menschen zeigten, dass zirkulierende Thrombozyten postinterventionell vermehrt aktivierungsabhängige Membranrezeptoren (P-Selektin, GP 53 und aktivierter GP IIb/IIIa Rezeptor) exprimieren sowie eine verstärkte Aggregationsneigung aufweisen. Während Untersuchungen von Scharf et al. sowie Gasparetti et al. eine verstärkte Thrombozytenaktivierung und Aggregation nur bei der Blutentnahme über den Koronarsinus beobachten konnten (80, 197), wurden in der Düsseldorf PTCA-Studie und in einer Untersuchung von Gawaz et al. auch bei peripher venösen Blutentnahmen eine verstärkte Thrombozytenaktivierung postinterventionell beobachtet (81, 123). In der Düsseldorf PTCA-Studie zeigte sich periinterventionell zunächst ein Abfall der Thrombozytenzahl mit Verlust aktivierter

Thrombozyten (P-Selektin, GP 53 und Thrombospondin), postinterventionell wurde jedoch Anstieg der Zahl aktivierter Thrombozyten beobachtet (121). In der Untersuchung von Gawaz et al. wurde 2-4 Tage nach koronarer Stentimplantation ein Maximum der thrombozytären Rezeptorexpression verzeichnet (81). Alternative Interventionstechniken, wie die direktionale Atherektomie und die Rotablation führen, vor allem durch ihre potentiell höheres traumatisierendes Potential bedingt, zu einer verstärkten Thrombozytenaktivierung im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie (11 52). Auch wird bei Patienten mit dem Bild eines akuten Koronarsyndroms ein verstärktes Ausmaß einer Thrombozytenaktivierung im Vergleich zu Patienten mit stabiler Angina pectoris Symptomatik beobachtet (7, 83). Die Analyse der Thrombozytenaktivierung in diesen Studien umfasste lediglich die Thrombozytenrezeptorexpression in unstimulierten Zellsuspensionen, was nur begrenzt Aussagen über die Thrombozytenfunktion erlaubt.

Ein verstärktes Ausmaß der Thrombozytenaktivierung scheint mit einem erhöhten Risiko postinterventioneller ischämischer Ereignisse assoziiert zu sein. Zwei Studien hierzu konnten zeigen, dass eine verstärkte Thrombozytenaktivierung vor dem Eingriff sowie eine verstärkte reaktive Aktivierung postinterventionell einen gewissen prädiktiven Wert für das Risiko akuter und subakuter ischämischer Komplikationen nach PTCA und Stentimplantation haben (82, 242).

Durch die Implantation von Stents wird, im Vergleich zur alleinigen Ballonangioplastie, postinterventionell ein größeres Gefäßinnenlumen ohne wesentliche Gefäßwanddissektionen im behandelten Gefäßsegment erzielt. Jedoch stellt die metallische Oberfläche der Stentstreben einen starken thrombogener Reiz dar. Untersuchungen in vitro konnten zeigen, dass der Kontakt mit der Stentoberfläche zur Aktivierung zirkulierender Thrombozyten führt (87). Auch in klinischen Untersuchungen konnte eine verstärkte Thrombozytenaktivierung nach koronarer Stentimplantation beobachtet werden (81). Die durch die Stentimplantation hervorgerufene lokale Zellaktivierung scheint ein wesentlicher Faktor für das Auftreten akuter und subakuter Gefäßverschlüsse darzustellen. Neuere Interventionstechniken wie die adjuvante Brachytherapie bergen ebenfalls ein erhöhtes Risiko thrombotischer Gefäßverschlüsse. Aufgrund einer verzögerten Reendothelialisierung des durch radioaktive Strahlung behandelten Gefäßsegmentes können diese auch noch mehrere Monate nach der Intervention auftreten (246).

Im Gegensatz zur Koronarintervention wird bei der diagnostischen Koronarangiographie keine verstärkte systemische Thrombozytenaktivierung beobachtet. Untersuchungen zum Einfluss verschiedener Kontrastmittel auf die Thrombozytenaktivierung zeigten, dass nicht-ionische und hochosmolare ionische Kontrastmittel in vitro eine verstärkte Zellaktivierung induzierten, während dieser Effekt für niedermolekulare ionische Kontrastmittel geringer ausgeprägt war (38). Unklar ist jedoch, welche klinische Bedeutung diese in vitro Beobachtungen haben. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Angiographien ausschließlich mit nicht-ionischen Kontrastmitteln durchgeführt, da diese das geringste Risikopotential für kardial bedingte Komplikationen aufweisen.

6.2 Koronarintervention und Entzündungsreaktionen

Reaktive Entzündungsreaktionen spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese akuter ischämischer Ereignisse sowie den Mechanismen, die zur Ausbildung von Restenosen nach Koronarinterventionen beitragen. In klinischen Untersuchungen konnte nach elektiver PTCA neben einer verstärkten Thrombozytenaktivierung auch ein Anstieg des Akut-Phase Proteins CRP, eine verstärkte Expression des Mac-1 Rezeptors und eine verminderte L-Selektin Expression auf Neutrophilen als Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion beobachtet werden (9, 202). Neumann et al. beobachteten insbesondere distal der dilatierten Koronarstenose Zeichen einer verstärkten Aktivierung zirkulierender Thrombozyten und Neutrophiler (166). In der vorliegenden Untersuchung konnte postinterventionell ein signifikanter geringer Anstieg des CRPs, der Plasmafibrinogenkonzentration sowie ein reversibler Anstieg der Leukozytenzahl beobachtet werden, was als Zeichen einer reaktiven Entzündungsreaktion gedeutet werden kann. Die Analyse des Differentialblutbildes zeigte hingegen keine signifikanten Veränderungen im Sinne einer reaktiven „Linksverschiebung“. Eine Analyse aktivierungsabhängiger leukozytärer Membranrezeptoren oder der Zytokinfreisetzung aus Leukozyten wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht durchgeführt.

Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion werden insbesondere bei Patienten mit dem klinischen Bild eines akuten Myokardinfarktes oder einer instabilen Angina pectoris beobachtet. Untersuchungen bei Patienten mit akuter Myokardischämie, die mit direkter Koronarangioplastie oder systemischer Thrombolyse behandelt wurden, zeigten eine vermehrte systemische Aktivierung zirkulierender Leukozyten, die von einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine begleitet waren (131, 167, 168). Aktivierte Neutrophile setzen auch Sauerstoffradikale frei, die Zellschäden in der Mikrovaskulatur verursachen und dadurch zu Reperfusionsschäden nach Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes beitragen können (122). Insbesondere zirkulierende Neutrophile und Monozyten tragen zu den reaktiven Entzündungsreaktionen nach einer Gefäßtraumatisierung bei, während Lymphozyten hierbei eine eher untergeordnete Rolle spielen (219).

Die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an zirkulierende Leukozyten scheint ein wichtiger Vermittler für reaktive Entzündungsreaktionen zu sein, wie sie im Rahmen thrombotischer Ereignisse beobachtet werden. In einer klinischen Untersuchung bei Patienten mit dem Bild eines akuten Koronarsyndroms wurde neben Zeichen einer vermehrten Aktivierung zirkulierender Leukozyten auch eine vermehrte Thrombozytenadhäsion an Leukozyten beobachtet (176). Die Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten wird vor allem durch den thrombozytären Membranrezeptor P-Selektin und das leukozytäre PSGL-1 vermittelt. Auch scheinen abgespaltene thrombozytäre Mikropartikel und die Membranrezeptoren GP IIb/IIIa und Mac-1 zur Zelladhäsion und zur Leukozytenaktivierung beizutragen (siehe 2.6). In vitro Untersuchungen konnten beobachten, dass die Adhäsion aktivierter Thrombozyten an Monozyten und PMN von einer vermehrten Bildung und Freisetzung der Zytokine IL 1 β , IL 8 und dem MCP-1 begleitet ist (165, 254).

6.3 Clopidogrel und Thrombozytenfunktion

Das oral verfügbare Thienopyridin Clopidogrel hemmt als aktiver Metabolit den membranständigen ADP-Rezeptor $P2Y_{12}$, wodurch es die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation effektiv hemmt (siehe 2.7.3). Die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen der reaktiven Thiolgruppe des aktiven Metaboliten und einem Cysteinrest des Rezeptors scheint für die Hemmung des $P2Y_{AC}$ -Rezeptors und damit für die biologische Aktivität des aktiven Metaboliten verantwortlich zu sein (196). Durch die Modifikation des $P2Y_{12}$ -Rezeptors wirkt Clopidogrel der ADP-vermittelten Hemmung der AC und einem Abfall der cAMP-Konzentration entgegen, während der durch den $P2X_1$ -Rezeptor vermittelte schnelle Kalziumeinstrom in die Zelle und die über den $P2Y_1$ -Rezeptor ($P2Y_{PLC}$) und eine PLC vermittelte Kalziummobilisation nicht wesentlich gehemmt werden. In vitro Untersuchungen mit dem $P2Y_{12}$ - ($P2Y_T$)-Rezeptorantagonisten AR-C69931MX zeigten, dass dieser Rezeptor v.a. für die Verstärkung der ADP-induzierten Aggregation, Degranulation und Sekretion sowie die Ausbildung stabiler Thrombozytenaggregate verantwortlich ist (216). Eine hemmende Wirkung auf die Zykl-oxygenaseaktivität und damit auf die Bildung von TxA₂ und Prostazyklin wurde unter der Hemmung des $P2Y_{12}$ -Rezeptors nicht beobachtet (51, 216). Die Hypothese, dass der $P2Y_{12}$ -Rezeptor v.a. für die Verstärkung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation und die Ausbildung stabiler Thrombozytenaggregate verantwortlich ist, wird durch die aggregometrischen Analysen der vorliegenden Untersuchung gestützt. Während durch Clopidogrel das maximale Ausmaß der ADP-induzierten Aggregation deutlich gehemmt wurde, war der Aggregationsgradient als ein Geschwindigkeitsparameter der ablaufenden Zellaggregation nur gering vermindert. Dies ist dadurch zu erklären, dass der über die ADP-Rezeptoren $P2X$ und $P2Y_1$ vermittelte und für die frühe Phase der Zellaktivierung verantwortliche, rasche Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Clopidogrel nicht gehemmt wird. Das gehäufte Auftreten spontaner Desaggregationen der Zellen nach der ADP-Stimulation unter Clopidogrel spricht für eine gewisse Instabilität der in vitro gebildeten Zellaggregate und stützt die Hypothese, dass der $P2Y_{12}$ -Rezeptor zur Bildung stabiler Aggregate beiträgt.

Dosisfindungsstudien zeigten, dass die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation unter einer Tagesdosis von 75mg Clopidogrel zu 30-45 % gehemmt ist. Durch eine weitere Steigerung der Tagesdosis ließ sich die Hemmwirkung nicht wesentlich steigern (22, 29). In der vorliegenden Untersuchung wurde unter Clopidogrel eine Hemmung der durch ADP induzierten maximalen Aggregation von 36,5% unter der geringen ADP-Konzentration [ADP 1,0] beobachtet, während unter der hohen ADP-Konzentration [ADP 5,0] eine 27%ige Hemmung verzeichnet wurde (siehe 5.6). Wahrscheinlich wird der $P2Y_{12}$ -Rezeptor durch Clopidogrel nicht komplett gehemmt, da $P2Y_{12}$ -Rezeptorantagonisten wie AR-C69931MX, der diesen ADP-Rezeptor mit hoher Bindungsaffinität blockiert, in vitro eine fast 80%ige Hemmung der ADP-induzierten Aggregation erzielen (216).

Neben der Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation beeinflussen Antagonisten des $P2Y_{12}$ -Rezeptors auch die durch andere Agonisten induzierte Zellaktivierung und Aggregation. So

wurden für Ticlopidin gering ausgeprägte Effekte auf die durch Kollagen und PAF, nicht jedoch auf die durch Epinephrin induzierte Aggregation beobachtet (98). Auch wurden unter Ticlopidin hemmende Effekte auf die thrombin-induzierte Aggregation und eine verstärkte spontane Desaggregation nach Thrombinstimulation beobachtet (32, 33). In vitro Untersuchungen mit dem P2Y₁₂-Rezeptorantagonisten AR-C69931MX zeigten, dass die durch TRAP, Kollagen und das Thromboxan Analogon U-46619 induzierte Zellaktivierung und Aggregation unabhängig von der Thromboxan-synthese gehemmt werden (216). Auch die dem Clopidogrel verwandte Substanz C-747 und dessen aktiver Metabolit R-99224 führten in vitro zu einer geringen Hemmung der kollagen- und thrombin-induzierten Aggregation (217). In einer Dosisfindungsstudie für Clopidogrel wurde hingegen keine signifikante Hemmung der kollagen-induzierten Aggregation beobachtet (22). Die Ergebnisse der vorliegenden klinischen Untersuchung stützen die These, dass durch eine medikamentöse Hemmung des P2Y₁₂-Rezeptors mit Clopidogrel auch die durch andere Agonisten induzierte Zellaktivierung und –aggregation gehemmt wird. Die Beeinflussung der durch Thrombin / TRAP, Kollagen oder Plasmin induzierten Zellaktivierung und –aggregation scheint vor allem darin begründet, dass intrazellulär gespeichertes und aktivierungsabhängig freigesetztes ADP die Zellaktivierung über einen positiven Rückkopplungsmechanismus verstärkt. Dieser wird durch eine Antagonisierung der ADP-Rezeptoren partiell gehemmt (105).

Moshfegh et al. untersuchten die Wirkung von Clopidogrel (75 mg/d), ASS (100 / 300 mg/d) und einer Kombination beider Substanzen auf die durch ADP, Kollagen und TRAP induzierte Thrombozytenaggregation sowie die Expression von P-Selektin, GP 53 und PAC-1 bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung (158). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass unter einer Kombination aus Clopidogrel und ASS nicht nur die ADP-induzierte, sondern auch die TRAP-induzierte Aggregation gegenüber einer Therapie mit ASS vermindert war. Während die Kollagen-induzierte Aggregation unter Clopidogrel stärker ausgeprägt war, zeigte sich unter der Kombination aus ASS und Clopidogrel eine gegenüber ASS verminderte Aggregation. Ähnliche Ergebnisse wurden für die Expression von P-Selektin, GP 53 und PAC-1 unter Stimulation mit ADP und Thrombin beobachtet. Auch für die Kombination aus Ticlopidin und ASS konnten ähnliche synergistische Effekte auf die Thrombozytenaktivierung und Aggregation im Rahmen von Koronarinterventionen beobachtet werden (192, 244). In der vorliegenden Untersuchung waren alle Patienten bereits mit ASS (100 mg/d) vorbehandelt. Unter dieser antiaggregatorischen Langzeittherapie führte die Gabe von Clopidogrel zu einer deutlichen Hemmung der ADP-induzierten und einer mäßigen Hemmung der TRAP-induzierten Thrombozytenaktivierung und -aggregation. Diese Beobachtungen stellen einen indirekten Hinweis dafür dar, dass durch die Kombination von ASS und Clopidogrel die aggregationshemmende Wirksamkeit gegenüber der ASS-Monotherapie gesteigert werden kann. Synergistische Effekte von Thienopyridinen und ASS können dadurch erklärt werden, dass durch die Substanzen unterschiedliche Wege der Thrombozytenaktivierung gehemmt werden. Während Thienopyridine primär der über den

P2Y₁₂-Rezeptor induzierten Hemmung der AC und der Dephosphorylierung des zytoskelettalen VASP entgegenwirken, hemmt ASS die Zyklooxygenase und damit die Bildung von TxA₂ in den Zellen. Durch ASS wird v.a. die durch Kollagen bzw. Epinephrin induzierte Aggregation gehemmt, während keine oder nur gering ausgeprägte Effekte auf die durch ADP und Thrombin induzierte Zellaktivierung und Aggregation beobachtet werden (178, 188).

GP IIb/IIIa Antagonisten hemmen durch eine Blockade des Fibrinogenrezeptors effektiv die Thrombozytenaggregation in vivo und in vitro (siehe 2.7.2). In vitro Untersuchungen zeigten, dass die im Rahmen der Zellaktivierung stattfindende Degranulation und Sekretion der Zellen durch GP IIb/IIIa Antagonisten im Gegensatz zu Clopidogrel nicht wesentlich gehemmt werden. Für die Kombination aus ASS bzw. Clopidogrel und einem GP IIb/IIIa Antagonisten konnten hingegen synergistische Effekte in Bezug auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Fibrinogenbindung beobachtet werden (121). In der vorliegenden Arbeit wurde durch Clopidogrel neben der ADP-induzierten Expression des aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptors (PAC-1) und der Fibrinogenbindung auch die Rekrutierung von GP IIb/IIIa Rezeptoren aus intrazellulären Speichern gehemmt. Die Hemmung dieser Rezeptorrekrutierung könnte einen möglichen Grund für synergistische Effekte von Clopidogrel und GP IIb/IIIa Antagonisten darstellen, da GP IIb/IIIa Antagonisten die intrazellulär gespeicherten Rezeptoren nur teilweise blockieren und eine Zellaggregation über die freigesetzten und nicht blockierten GP IIb/IIIa Rezeptoren stattfinden kann. Für diese Hypothese sprechen klinische Untersuchungen von Gawaz et al., die unter einer Therapie mit Abciximab nur eine partielle Hemmung der TRAP-induzierten Aggregation beobachten konnten (84).

Untersuchungen bei gesunden Probanden und Patienten mit Atherosklerose zeigten für die beiden Thienopyridine Clopidogrel (75 mg/d) und Ticlopidin (250 mg/bid) eine vergleichbare Hemmung der ADP-induzierten Aggregation (22). Während die maximal zu erzielende Aggregationshemmung unter Ticlopidin erst nach 5-7 Tagen erreicht wird, zeigt sich diese unter Clopidogrel bereits nach ca. 3 Tagen der Therapie. Durch eine Aufsattdosis (300-600 mg) kann eine Beschleunigung der aggregationshemmenden Wirkung erzielt werden (238). In der vorliegenden Untersuchung führte die Gabe von 300mg Clopidogrel bereits 6 Stunden nach Therapiebeginn zu einer fast maximalen Hemmung der ADP-induzierten Expression von P-Selektin, GP 53 und PAC-1 sowie der ADP-induzierten Aggregation. Das Ausmaß der Hemmung blieb unter 75 mg/d in dem 7tägigen Beobachtungszeitraum erhalten. Die klinische Wirksamkeit und Sicherheit dieses Dosisregimes im Rahmen von Koronarinterventionen konnten in der CLASSICS-Studie belegt werden (19).

Die Hemmung des ADP-Rezeptors durch Clopidogrel und Ticlopidin scheint irreversibel, da die Thrombozytenaggregation noch mehrere Tage nach Beendigung der Therapie gehemmt bleibt (29, 125). Da der Beobachtungszeitraum dieser Studie auf 7 Tage festgelegt war und keine Laboranalysen nach Absetzen der Medikation durchgeführt wurden, können für dieses Patientenkollektiv im

Gegensatz zum Einsetzen antiaggregatorischen Wirkung von Clopidogrel keine Aussagen über das Abklingen der Aggregationshemmung gemacht werden.

Die Therapie mit Clopidogrel (75 mg/d) führt im Mittel zu einer 30-45%igen Hemmung der ADP-induzierten Aggregation. Mögliche Einflussgrößen auf die antiaggregatorische Wirkung von Clopidogrel wurden bisher nicht beschrieben. Eine Analyse potentieller Einflussgrößen auf Wirkung von Clopidogrel in der vorliegenden Untersuchung zeigte, dass in der Gruppe der Diabetiker die Hemmung der ADP-induzierten Aggregation unter Clopidogrel tendenziell geringer ausgeprägt war. In der Gruppe der Frauen wurde die initial geringer ausgeprägte ADP-induzierte Expression von P-Selektin durch Clopidogrel weniger stark gehemmt. Andere demographische Patientendaten sowie prozedurale Faktoren hatten keinen Einfluss auf die Wirkung von Clopidogrel. Auch die Thrombozytenzahl und die Fibrinogenkonzentration zeigten keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der Thrombozytenaktivierung und Aggregationshemmung unter Clopidogrel (siehe 5.8).

In seltenen Fällen können durch Thienopyridine schwerwiegende Blutbildveränderungen (Neutropenien, Thrombozytopenien) hervorgerufen werden, wobei das Risiko für Clopidogrel gegenüber Ticlopidin deutlich geringer ausgeprägt ist (13). In der vorliegenden Untersuchung wurden bei geringer Patientenzahl keine schwerwiegenden Blutbildveränderungen unter der Therapie beobachtet. Lediglich ein geringer Anstieg der Leukozytenzahl und ein leichter Abfall der Hämoglobinkonzentration wurden beobachtet, was am ehesten durch den invasiven Eingriff zu erklären ist. Unter Clopidogrel wurde keine signifikante Änderung der Thrombozytenzahl und des mittleren Thrombozytenvolumens beobachtet.

Experimentelle und klinische Untersuchungen lieferten Hinweise, dass Thrombozytenaggregationshemmer nicht nur die Aggregation der Thrombozyten, sondern auch die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten beeinflussen. So konnte unter einer antiaggregatorische Therapie mit ASS und Ticlopidin nach koronarer Stentimplantation ein vermindertes Ausmaß der Adhäsion von Thrombozyten an Monozyten sowie eine verminderte Aktivität der Monozyten (charakterisiert durch die Expression von Mac-1 und L-Selektin) beobachtet werden (139). Auch konnte bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom durch den Einsatz von GP IIb/IIIa Antagonisten, neben der Hemmung der Thrombozytenaggregation und der Fibrinogenbindung auch eine signifikante Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten an Neutrophile beobachtet werden (257). Die vorliegende Untersuchung konnte zeigen, dass durch die Therapie mit Clopidogrel das Ausmaß der Adhäsion von Thrombozyten an Neutrophile und Monozyten deutlich gehemmt wird. Dies betraf insbesondere die ADP-induzierte TLA-Bildung, jedoch auch die TLA-Bildung unter TRAP war vermindert. Die Hemmung der TLA-Bildung unter Clopidogrel erfolgte dabei ebenso rasch wie die Hemmung der Zelldegranulation und der Aggregation. Sowohl das Ausmaß der TLA-Bildung vor Therapiebeginn wie auch die Hemmung der TLA-Bildung unter Therapie mit Clopidogrel korrelierten signifikant mit der Expression von P-Selektin auf der Thrombozytenoberfläche. Das thrombozytäre P-Selektin ist ein zentraler Rezeptor der

Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion, da diese durch eine Bindung von P-Selektin und den leukozytären Membranrezeptor PSGL-1 vermittelt wird (siehe 2.6). Eine Analyse der Expression aktivierungsabhängiger leukozytärer Membranrezeptoren oder der Zytokinsynthese und -freisetzung zur Charakterisierung der Leukozytenaktivität wurde im Rahmen dieser Untersuchung nicht durchgeführt.

6.4 Koronarinterventionen unter Einsatz von Clopidogrel

Im Rahmen von Koronarinterventionen mit Stentimplantation werden Thienopyridine eingesetzt, um das Ausmaß einer reaktiven Thrombozytenaktivierung zu hemmen und so das Risiko akuter oder subakuter thrombotischer Gefäßverschlüsse zu reduzieren. Die ISAR-Studie konnte zeigen, dass durch eine vierwöchige Therapie mit Ticlopidin und ASS nach koronarer Stentimplantation die Inzidenz ischämischer Komplikationen sowie nicht-kardialer Ereignisse gegenüber einer Therapie mit Phenprocoumon deutlich gesenkt werden konnte (199). Diese Beobachtungen konnten durch mehrere große Interventionsstudien bestätigt werden. Auch gegenüber einer Monotherapie mit ASS konnte durch die Kombination aus Ticlopidin und ASS eine signifikant geringere Inzidenz postinterventioneller ischämischer Ereignisse erzielt werden (18, 127, 243). Analysen der Thrombozytenaktivierung und Aggregation nach Koronarinterventionen zeigten, dass durch die Therapie mit Ticlopidin plus ASS das Ausmaß der Zellaktivierung und der Aggregation im Vergleich zu einer oralen Antikoagulation sowie der ASS-Monotherapie gesenkt werden konnte (192).

Clopidogrel weist im Vergleich zu Ticlopidin eine bessere Verträglichkeit und günstigere Nebenwirkungsspektrum bei vergleichbarer antiaggregatorischer Wirkung auf. Der Einsatz von Clopidogrel als adjuvante Therapie bei Koronarinterventionen wurde in mehreren Studien untersucht. Die hierzu durchgeführten randomisierten und nicht-randomisierten Interventionsstudien zeigten im Vergleich zu Ticlopidin (plus ASS) vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf kardiale ischämische Ereignisse, während unter Clopidogrel (plus ASS) signifikant weniger nicht-kardiale Nebenwirkungen beobachtet wurden (19). In diesen Studien wurde die Therapie mit Clopidogrel oder Ticlopidin jedoch erst nach erfolgreicher koronarer Stentimplantation begonnen. Der Einfluss einer präinterventionell begonnenen Therapie mit Clopidogrel auf die Thrombozytenaktivierung und Aggregation ist bisher nicht untersucht worden. In der vorliegenden Untersuchung konnte durch die vor dem geplanten Eingriff begonnene Therapie mit Clopidogrel eine rasche Hemmung der Rezeptorexpression und der Aggregation erzielt werden. Unter der Therapie waren die Expression der aktivierungsabhängigen Membranrezeptoren, die TLA-Bildung und die Thrombozytenaggregation postinterventionell nicht signifikant erhöht. Vielmehr konnte durch die präinterventionell begonnene Therapie eine gewisse Passivierung der Thrombozytenaktivierung und der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion erzielt werden. In dem untersuchten Patientenkollektiv wurden bei einer, für eine klinische Endpunktanalyse zu kleinen Fallzahl postinterventionell keine akuten oder subakuten ischämischen Komplikationen

beobachtet. Schwere Blutungskomplikationen oder andere schwerwiegende nicht-kardiale Nebenwirkungen wurden ebenfalls nicht beobachtet. Größere multizentrische Untersuchungen sind daher notwendig, um die Sicherheit und die Effektivität einer Therapie mit Clopidogrel vor geplanter Koronarintervention zu untersuchen.

6.5 Methoden der Thrombozytenfunktionsdiagnostik

Verschiedene Tests wurden entwickelt, um die Thrombozytenfunktion im Rahmen klinischer Fragestellungen zu analysieren. Lange Zeit galten die Thrombozytenaggregations und -agglutinationstests als Standardverfahren zur laborchemischen Analyse der Thrombozytenfunktion. Das Prinzip der Aggregationstests beruht auf der Messung des Aggregationsverhalten der Thrombozyten unter Zugabe verschiedener Agonisten (74, 161). In der Regel werden hierfür die Substanzen Thrombin / TRAP, ADP, Kollagen, Epinephrin und Arachidonsäure eingesetzt. Die durch die Agonisten induzierte Zellaktivierung führt schließlich zur Aggregation der Thrombozyten über Fibrinogenbrückenbindungen zwischen den membranständigen GP IIb/IIIa Rezeptoren. Da diese Reaktion kalziumabhängig ist, erfolgt die Messungen im Citratblut / -plasma bei ausreichender Kalziumkonzentration. Die Ausbildung der Thrombozytenaggregate oder der Agglutination kann turbidimetrisch oder mit Hilfe der Impedanzmethode gemessen werden. Während die turbidimetrische Methode die Änderung der Lichttransmission beim Durchtritt durch eine Suspension aus Thrombozyten misst, die proportional zum Ausmaß der Aggregatbildung in der Zellsuspension zunimmt (23), misst die Impedanzmethode den Leitungswiderstand zwischen zwei Elektroden, der sich durch anhaftende Thrombozytenaggregate nach Stimulation erhöht (31). Mit einem Lumineszenzaggrometer kann parallel zum Aggregationsverhalten die ATP-Freisetzung aus den Granula mit Hilfe eines Luciferin-Luciferase Reagenz gemessen werden. Eine weitere Möglichkeit zur Quantifizierung des Aggregationsverhaltens ist die Messung nicht aggregierter Einzelthrombozyten in einer Zellsuspension nach Stimulation. Während hiermit auch schwache Zellaggregationen gemessen werden können, liegen die Nachteile dieser Methode in der Diskontinuität der Messungen sowie der Abhängigkeit der Messergebnisse von der Güte der Zählkammer (75). Ein wesentlicher Nachteil aller Aggregations- bzw. Agglutinationstests ist die starke Abhängigkeit von der Thrombozytenkonzentration im Plasma sowie der Güte des Agonisten. In der Regel wird das plättchenreiche Citratplasma deshalb mit PPP auf eine definierte Zellkonzentration (200.000 - 250.000 / μ l) verdünnt. Die Messung der Thrombozytenaggregation ab einer Plasmakonzentration unter 100.000 / μ l erscheint aufgrund einer mangelnden Aggregationsfähigkeit in vitro nicht mehr sinnvoll. Die Ergebnisse der Aggregationstests ermöglichen Aussagen über die Reaktivität der Thrombozyten auf einen definierten Stimulus. Der Einfluss bestimmter klinischer Situationen auf die Thrombozytenaktivierung kann nicht direkt bestimmt werden. Strukturelle Funktionsdefizite, wie etwa eine verminderte Expression oder gar das Fehlen bestimmter

Membranrezeptoren können nur indirekt über ein geändertes Aggregationsverhalten analysiert werden (74).

Aktivierte Thrombozyten setzen in vivo wie auch in vitro intrazellulär gespeicherte Substanzen frei. Hierzu zählen unter anderem Beta-Thromboglobulin (β -TG), Plättchenfaktor 4 (PF4), P-Selektin oder TxA₂. Die bei der Zellaktivierung freigesetzten plättchenspezifischen Proteine können im Plasma mittels Radio- oder Enzymimmunoassay gemessen werden (115). Die quantitative Bestimmung freigesetzter plättchenspezifischer Proteine erlaubt Aussagen zur Thrombozytenaktivierung im Rahmen bestimmter klinischer Situationen. So werden erhöhte Plasmaspiegel des β -TG und des PF-4 bei Patienten mit akuter Myokardischämie oder Apoplex sowie bei Patienten mit Diabetes mellitus oder peripherer arterieller Verschlusskrankung beobachtet (73). Auch kann mit diesen Tests das Verhalten der Thrombozyten auf eine in vitro Aktivierung gemessen werden. Die Analyse von β -TG und des PF-4 weist gewisse Limitationen auf. So führt Heparin zur Freisetzung von gespeichertem PF4 aus dem Endothel damit zu erhöhten Plasmaspiegeln. Erhöhte Plasmakonzentrationen von PF4 und β -TG werden auch bei Patienten mit chronischem Nierenversagen gefunden, da beide Substanzen renal eliminiert werden. Auch die Präparationsschritte der Plasmasparation machen die RIA- bzw. ELISA-Assays von β -TG und PF4 anfällig für eine artifizielle in vitro Aktivierung (138). Die Analyse des freigesetzten TxA₂ sowie der Thromboxanmetaboliten kann im Urin oder im Plasma erfolgen. Das über eine Thromboxansynthetase gebildete TxA₂ besitzt eine sehr kurze Halbwertszeit und wird zu dem stabileren TxB₂ abgebaut. Die Analyse des TxB₂ im Plasma oder im Urin dient als Maß der zyklooxygenaseabhängigen Thrombozytenaktivierung. Erhöhte Plasmaspiegel lassen auf eine verstärkte systemische Thrombozytenaktivierung schließen. Keine der genannten Methoden erlaubt jedoch das Ausmaß der Aktivierung einzelner Thrombozyten zu analysieren oder Thrombozyten-subpopulationen zu erfassen.

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können verschiedene zelluläre Teilaspekte der Thrombozytenaktivierung analysiert werden. Zum einen können morphologische Veränderungen der Zelle gemessen werden, wie etwa die Gestaltänderung, die Aktivierung des Zytoskeletts oder die Freisetzung thrombozytärer Mikropartikel. Auch kann die aktivierungsabhängige Änderung der intrazellulären Kalziumkonzentration analysiert werden. Schließlich kann die Expression membranständiger Rezeptoren auf der Zelloberfläche mit Hilfe spezifischer Antikörper quantifiziert werden. Während die Analyse der konstitutiv exprimierten Rezeptorkomplexe GP IIb/IIIa und GP Ib/V/IX vor allem der Identifizierung der Thrombozytenpopulation und dem direkten Nachweis thrombozytärer Rezeptordefekte (Bernard-Soulier Syndrom, Glanzmann-Thrombasthenie) dient, kann das Ausmaß der Zellaktivierung über die aktivierungsabhängige Expression intrazellulär gespeicherter Rezeptoren (P-Selektin, GP 53, LAMP-1/2) auf der Zelloberfläche analysiert werden. Auch die aktivierungsabhängige Internalisierung des GP Ib/V/IX, die Rekrutierung von GP IIb/IIIa Rezeptoren sowie die Identifizierung von aktivierten und in ihrer Konformation geänderten GP IIb/IIIa Rezeptoren über

spezifische Antikörper (PAC-1 / LIBS) dienen der Charakterisierung der Thrombozytenaktivität. Für die Methodik der durchflusszytometrischen Charakterisierung von Thrombozytenaktivierung und -funktion wurde 1998 ein Konsensusprotokoll der europäischen Arbeitsgruppe für klinische Zelldiagnostik erstellt (198). Die in dieser Arbeit eingesetzte Methodik der durchflusszytometrischen Thrombozytenfunktionsdiagnostik wurde in Anlehnung an die Leitlinien des Konsensusprotokolls durchgeführt (siehe 4.4 und 4.5).

Thrombozyten sind sehr anfällig für eine artifizielle in vitro Aktivierung. So führen Präparationsschritte wie die Herstellung von PRP, das „Waschen“ von Thrombozyten, eine mehrstündige Lagerung unfixierter Zellsuspensionen oder stärkere Temperaturschwankungen zu einer artifiziellen Zellaktivierung. Neuere Protokolle für die Thrombozytenfunktionsdiagnostik beschränken sich deshalb auf ein Minimum an Präparationsschritten, eine möglichst rasche Probenaufarbeitung und die Fixierung der Probe mit (Para-) Formaldehyd, um das Ausmaß einer artifiziellen Aktivierung in vitro zu minimieren. Auch in der vorliegenden Untersuchung wurde versucht durch eine rasche Probenaufarbeitung mit direkter Fixierung und die Analyse in verdünnter Vollblutsuspension das Ausmaß einer artifiziellen in vitro Aktivierung zu minimieren. Die Fixierung der Blutprobe erfolgte entgegen früheren Messprotokollen nicht direkt nach der Blutentnahme (242), sondern erst nach der Probenaufarbeitung. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da eine Stimulation mit ADP und TRAP in fixierten Proben nicht mehr durchführbar ist. Während frühere Protokolle der Thrombozytenfunktionsdiagnostik lediglich die Analyse unstimulierter Thrombozyten beinhalten (147), erlaubt die in vitro Stimulation mit ADP, TRAP oder anderen Agonisten Aussagen über die Funktionsfähigkeit der Zellen zu treffen (138, 148). Diese ist besonders dann erforderlich, wenn die Wirkung bestimmter Pharmaka auf die Thrombozytenfunktion analysiert werden soll. In der vorliegenden Untersuchung wurden die Agonisten ADP und TRAP für eine in vitro Stimulation der Zellen ausgewählt, da sie zentrale Mechanismen der Zellaktivierung vermitteln und Clopidogrel einen ADP-Rezeptor funktionell hemmt. Parallel wurde die Aggregationsfähigkeit der Zellen mit Hilfe der turbidimetrischen Aggregometrie im PRP unter Zugabe der Agonisten ADP und TRAP untersucht. Somit standen zwei unterschiedliche analytische Verfahren für die Charakterisierung der Thrombozytenfunktion zur Verfügung. Insgesamt zeigten beide Methoden gute Übereinstimmungen in der Analyse der Thrombozytenfunktion unter Clopidogrel. So korrelierte etwa das Ausmaß der maximalen Aggregation mit der Expression des aktivierten GP IIb/IIIa Rezeptors und der Fibrinogenbindung in den durchflusszytometrischen Analysen (siehe 5.8).

Ein wesentlicher Nachteil aller Thrombozytenfunktionstests ist die starke Abhängigkeit der Messergebnisse vom Zeitintervall zwischen der Blutentnahme und der Probenaufarbeitung bis hin zur Analyse der Proben. Untersuchungen hierzu zeigten eine deutlich vermehrte Expression von P-Selektin, GP 53 und PAC-1, sofern die Probe nicht direkt bzw. innerhalb von 30 Minuten, sondern erst nach 60 oder 90 Minuten aufgearbeitet wurden. Auch ist die Rezeptorexpression abhängig von der

Dauer der Inkubation mit dem Agonisten. Erst die Fixierung mit Formaldehyd erlaubt ein längeres Zeitintervall zwischen der Probenaufarbeitung und der Analyse im Durchflusszytometer, da die Rezeptorexpression nach der Fixierung über mehrere Stunden konstant bleibt. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb ein maximales Zeitintervall von 30 Minuten für den Beginn der Probenaufarbeitung definiert, und die Zellsuspensionen wurden direkt nach der Aufarbeitung fixiert.

Die Analyse der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion mit Hilfe der Durchflusszytometrie ist ein vergleichsweise neues Messverfahren. Die methodischen Ansätze basieren auf dem Prinzip, dass Leukozyten und Thrombozyten im verdünnten Vollblut durch spezifische MoAbs unterschiedlicher Fluoreszenz markiert werden können und durch das Übereinanderlegen der Fluoreszenzsignale in einer Punktwolke spezifische Leukozyten identifiziert werden können, die einen oder mehrere Thrombozyten gebunden haben (129, 189). Auch lassen sich einzelne Leukozytenpopulationen identifizieren und deren Interaktionen mit Thrombozyten charakterisieren (siehe 4.5.7). Die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten ist reversibel und die TLA-Bildung im verdünnten Vollblut ist abhängig vom Zeitintervall der Probenaufbereitung sowie der Präparation der Probe. Aus diesem Grund versucht, durch ein Minimum an Präparationsschritten und eng definierte Zeitintervalle das Ausmaß artifizieller TLA-Bildungen in vitro zu minimieren.

6.6 Limitationen der Arbeit

Bei einem Kollektiv von 40 Patienten war die Untersuchung lediglich für eine validierte Analyse laborchemischer Parameter, nicht jedoch für eine klinische Endpunktanalyse ausgelegt. Die dargestellten klinischen Ergebnisse (kardiale und nicht-kardiale Ereignisse postinterventionell; Nebenwirkungsspektrum von Clopidogrel) sind daher nur bedingt zu interpretieren. Eine Kontrollgruppe von Patienten, die kein Clopidogrel im Rahmen des Eingriffs erhielten, wurde nicht untersucht. Da in der STARS-Studie unter einer ASS-Monotherapie im Vergleich zur Kombination aus ASS plus Ticlopidin eine deutlich höhere Inzidenz kardialer Ereignisse beobachtet wurde (127), erscheint die Durchführung einer Koronarintervention und Stentimplantation ohne den Schutz der Thienopyridine nicht mehr vertretbar. Da die Untersuchung nicht doppelblind durchgeführt wurde, kann eine Beeinflussung der Messergebnisse durch die Kenntnis der Medikation und des Messzeitpunktes nicht ausgeschlossen werden. Ein Vergleich der aggregationshemmenden Eigenschaften von Clopidogrel und Ticlopidin im Rahmen von Koronarinterventionen ist in dieser Arbeit nicht dargestellt. Frühere Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass beide Substanzen hinsichtlich ihrer aggregationshemmenden Wirkung vergleichbar sind (22). Auch konnten mehreren Studien zeigen, dass beide Substanzen hinsichtlich der Prävention ischämischer kardialer Ereignisse nach koronarer Stentimplantation vergleichbar sind, während Clopidogrel eine insgesamt bessere Verträglichkeit aufweist.

Die durchflusszytometrischen Analysen thrombozytärer Zellaktivierung und die Aggregationsmessungen umfassten mit ADP und TRAP zwei zentrale Agonisten der Zellaktivierung. Eine Analyse

der Zellaktivierung und Aggregation unter Stimulation mit anderen Agonisten wie Kollagen oder Epinephrin wäre wünschenswert gewesen, war jedoch aufgrund der Vielzahl der analysierten Parameter und der eng definierten Zeitfenster für die Thrombozytenfunktionsanalytik praktisch nicht umsetzbar. Für die laborchemischen Untersuchungen wurden fünf Messzeitpunkte vor und nach Therapiebeginn definiert. Diese wurden so gewählt, um das Ausmaß der Zellaktivierung und Aggregation zu einem frühen Zeitpunkt nach Therapiebeginn sowie zu einem frühen Zeitpunkt nach der Koronarintervention zu erfassen. Da keine Analysen über den Zeitpunkt 7 Tage nach Therapiebeginn mit Clopidogrel hinaus vorgesehen waren, lassen sich keine Aussagen über die antiaggregatorische Langzeitwirkung und die Wiederherstellung der Thrombozytenfunktion nach Beendigung der Therapie machen. Phase II-Studien konnten jedoch zeigen, dass sich das Ausmaß der Aggregationshemmung unter Clopidogrel nach 7 Tagen nicht mehr signifikant ändert und die Wiederherstellung der Aggregation durch die irreversible Hemmung des ADP-Rezeptors verzögert ist. Ein zentraler Aspekt der laborchemischen Analysen betraf die Interaktionen zwischen Thrombozyten und Leukozyten unter der antiaggregatorischen Therapie. Es wurde beschrieben, dass die Adhäsion aktivierter Thrombozyten eine Aktivierung von Neutrophilen und Monozyten induziert. Ein direkter Nachweis, dass die verminderte TLA-Bildung auch zu einer verminderten Leukozytenaktivierung beiträgt, konnte in dieser Untersuchung jedoch nicht erbracht werden.

6.7 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigen, dass durch Clopidogrel (300mg Aufsättigungsdosis) bereits nach 6 Stunden ein fast maximales Ausmaß der Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaktivierung und Aggregation erzielt wird. Das Ausmaß der Hemmung bleibt unter einer Tagesdosis von 75mg erhalten. Da diese Effekte unter einer antiaggregatorischen Therapie mit ASS beobachtet wurden, kann eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen angenommen werden. Durch die Kombination aus ASS und Clopidogrel wird eine gewisse Passivierung der Thrombozytenfunktion erreicht ohne eine signifikante Thrombozytenaktivierung nach elektiver Koronarintervention. Es erscheint daher sinnvoll, die Therapie mit Clopidogrel vor einer geplanten Koronarintervention zu beginnen, um das Ausmaß einer postinterventionellen Aktivierung zirkulierender Thrombozyten und einer durch Thrombozytenadhäsion induzierten Leukozytenaktivierung zu reduzieren. Größere multizentrische Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die Sicherheit und die Effektivität einer Therapie mit Clopidogrel vor geplanter Koronarintervention zu untersuchen. Aufgrund des gezeigten raschen Wirkungsbeginns bei Einsatz eines Aufsättigungsschemas mit einer effektiven Hemmung der Zelldegranulation und Sekretion, der Aggregation und der Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen scheint die Therapie mit Clopidogrel auch eine geeignete Wahl für die Behandlung von Patienten mit dem Bild eines akuten Koronarsyndroms darzustellen.

6.8 Perspektiven

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden Patienten mit bekannter koronarer Herzerkrankung und stabiler Angina pectoris Symptomatik untersucht. Es wäre von großem Interesse zu untersuchen, ob Clopidogrel denselben positiven Einfluss auf Thrombozytenfunktion und Thrombozyten-Leukozyten Interaktionen bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom hat. Im Rahmen einer solchen Studie könnte auch untersucht werden, welchen Einfluss die unter Clopidogrel beobachtete Hemmung der Adhäsion von Thrombozyten an Leukozyten auf die Zellaktivierung der Leukozyten hat.

Obwohl durch Clopidogrel die ADP-induzierte Thrombozytenaktivierung und -aggregation im Mittel effektiv gehemmt wird, ist derzeit noch unklar, ob die Hemmung durch Einflussgrößen auf zellulärer Ebene, Medikamenteninteraktionen, bestimmte Laborparameter oder Patientencharakteristika beeinflusst wird. Neben der Untersuchung möglicher Faktoren, die einen Einfluss auf die aggregationshemmende Wirkung von Clopidogrel haben, wäre es wünschenswert zu untersuchen, ob eine verminderte Hemmung der Thrombozytenaktivierung und -aggregation mit einem erhöhten Risiko kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert ist.

7 Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Thrombozytenfunktion und der Thrombozyten-Leukozyten Adhäsion (TLA) im Rahmen von Koronarinterventionen unter einer Therapie mit dem Thienopyridin Clopidogrel. Untersucht wurden die Expression aktivierungsabhängiger membranständiger Thrombozytenrezeptoren, die Thrombozytenadhäsion an Leukozyten und die Aggregation bei 40 Patienten mit koronarer Herzerkrankung, die vor geplanter Koronarintervention mit Clopidogrel (300mg Aufsättigungsdosis, 75mg/d Erhaltungsdosis) behandelt wurden. Bereits 6 Stunden nach Therapiebeginn war eine signifikante Hemmung der durch Adenosindiphosphat (ADP) induzierten Expression der Membranrezeptoren P-Selektin und Glykoprotein (GP) 53 zu beobachten, deren Ausmaß unter der Erhaltungsdosis bestehen blieb. Auch die durch das Thrombin Rezeptor aktivierende Peptid (TRAP) induzierte Rezeptorexpression war unter Clopidogrel signifikant vermindert. Daneben wurde eine vermehrte Hemmung der Internalisierung des GP Ib Rezeptors und eine deutliche Hemmung der thrombozytären Fibrinogenbindung beobachtet. Auch wurde die Rekrutierung von GP IIb/IIIa Rezeptoren auf der Zelloberfläche und die Expression aktivierter GP IIb/IIIa Rezeptoren signifikant gehemmt. Neben der verminderten Thrombozytenrezeptorexpression war die Thrombozytenadhäsion an Neutrophile und an Monozyten unter Clopidogrel deutlich vermindert. Auch hier konnte bereits nach 6 Stunden eine signifikante Hemmung der ADP-induzierten TLA-Bildung verzeichnet werden, die im weiteren Verlauf erhalten blieb. Das Ausmaß der TLA-Bildung vor Therapiebeginn und unter Clopidogrel korrelierte signifikant mit der Expression des thrombozytären P-Selektin. Die Thrombozytenaggregation wurde ebenfalls rasch und signifikant durch Clopidogrel gehemmt. Neben der Hemmung der ADP-induzierten Aggregation war auch die TRAP-induzierte Aggregation leicht vermindert. Unter der Clopidogrel-Therapie wurde postinterventionell kein signifikanter Anstieg der Expression thrombozytärer Membranrezeptoren, der TLA-Bildung oder der Thrombozytenaggregation beobachtet.

Clopidogrel führt als Aufsättigungsdosis zur raschen Hemmung der Thrombozytenfunktion, welche die agonisten-induzierte Expression der intrazellulär gespeicherter Membranrezeptoren P-Selektin und GP 53, die Internalisierung des GP Ib, die Rekrutierung und Expression aktivierter GP IIb/IIIa Rezeptoren sowie die Fibrinogenbindung und die Thrombozytenaggregation beinhaltet. Darüber hinaus wird die Thrombozytenadhäsion an zirkulierende Leukozyten signifikant gehemmt. Das Ausmaß der Funktionshemmung bleibt unter der Erhaltungsdosis bestehen. Durch die Therapie mit Clopidogrel scheint eine Passivierung der Thrombozytenfunktion ohne signifikanten reaktiven Anstieg der Expression membranständiger Rezeptoren oder der Aggregation nach elektiver Koronarintervention induziert zu werden.

8 Literaturverzeichnis

- 1) Abrams, C., Deng, J., Steiner, B., Shattil, S.J. (1994): Determinants of specificity of a baculovirus-expressed antibody Fab fragment that binds selectively to the activated form of integrin α IIb β 3. *J. Biol. Chem.* 137, 18781-88.
- 2) Aguirre F.V. for the EPIC Investigators (1995): Bleeding complications with the chimeric antibody to platelet glycoprotein IIb/IIIa integrin in patients undergoing percutaneous coronary intervention. *Circulation.* 91, 2882-90.
- 3) Alberio, L., Dale, G.L. (1999): Review article: platelet-collagen interactions: membrane receptors and intracellular signalling pathways. *Eur. J. Clin. Invest.* 29, 1066-76.
- 4) Andrews, R.K., Shen, Y., Gardiner, E.E., Dong, J.F., Lopez, J.A., Berndt, M.C. (1999): The glycoprotein Ib-IX-V complex in platelet adhesion and signaling. *Thromb. Haemost.* 82, 357-64.
- 5) Antiplatelet Trialists' Collaboration (1994): Collaborative overview of randomised trials of antiplatelet therapy, I: prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *B.M.J.* 308, 81-106.
- 6) Arai, M., Yamamoto, N., Moroi, M., Akamatsu, N., Fukutake, K., Tanoue, K. (1995): Platelets with 10% of the normal amount of glycoprotein VI have an impaired response to collagen that results in a mild bleeding tendency. *Br. J. Haematol.* 89, 124-30.
- 7) Ault, K.A., Cannon, C.P., Mitchell, J., McCahan, J., Tracy, R.P., Novotny, W.F., Reimann, J.D., Braunwald, E. (1999): Platelet activation in patients after an acute coronary syndrome: results from the TIMI-12 trial. *Thrombolysis in Myocardial Infarction. J. Am. Coll. Cardiol.* 33, 634-39.
- 8) Awtry, E.H., Loscalzo, J. (2000): Aspirin. *Circulation* 101, 1206-18.
- 9) Azar, R.R., McKay, R.G., Kiernan, F.J., Seecharran, B., Feng, Y.J., Fram, D.B., Wu, A.H., Waters, D.D. (1997): Coronary angioplasty induces a systemic inflammatory response. *Am. J. Cardiol.* 80, 1476-8.
- 10) Badimon, L., Chesebro, J.H., Badimon, J.J. (1992): Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 86, III74-III85.
- 11) Bau, J., Gutensohn, K., Kuck, K.H., Beythien, C., Stein, J., Kuhn, P. (2000): Durchflußzytometrisch nachgewiesene Aktivierung von Thrombozyten im Verlauf der Rotablation. *Z. Kardiol.* 89, 15-20.
- 12) Benka, M.L., Lee, M., Wang, G.R., Buckman, S., Burlacu, A., Cole, L., DePina, A., Dias, P., Granger, A., Grant, B. (1995): The thrombin receptor in human platelets is coupled to a GTP binding protein of the G alpha q family. *FEBS Lett.* 363, 49-52.
- 13) Bennett, C.L., Connors, J.M., Carwile, J.M., Moake, J.L., Bell, W.R., Tarantolo, S.R., McCarthy, L.J., Sarode, R., Hatfield, A.J., Feldman, M.D., Davidson, C.L., Tsai, H.M. (2000): Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with clopidogrel. *N. Engl. J. Med.* 342, 1773-77.
- 14) Bennett, J.S., Shattil, S.J., Power, J.W., Gartner, T.K. (1988): Interaction of fibrinogen with its platelet receptor. Differential effects of alpha and gamma chain fibrinogen peptides on the glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 263, 12948-53.
- 15) Berger, P.B., Bell, M.R., Rihal, C.S., Ting, H., Barsness, G., Garratt, K., Bellot, V., Mathew, V., Melby, S., Hammes, L., Grill, D., Holmes, D.R. (1999): Clopidogrel versus ticlopidine after intracoronary stent placement. *J. Am. Coll. Cardiol.* 34, 1891-94.
- 16) Berkowitz, S.D., Harrington, R.A., Rund, M.M., Tchong, J.E. (1997): Acute profound thrombocytopenia after c7E3 Fab (abciximab) therapy. *Circulation.* 95, 809-13.
- 17) Bertagnoli, M.E., Beckerle, M.C. (1993): Evidence for the selective association of a subpopulation of GPIIb-IIIa with the actin cytoskeletons of thrombin-activated platelets. *J. Cell. Biol.* 121, 1329-42.

- 18) Bertrand, M.E., Legrand, V., Boland, J., Fleck, E., Bonnier, J., Emmanuelson, H., Vrolix, M., Missault, L., Chierchia, S., Casaccia, M., Niccoli, L., Oto, A., White, C., Webb-Peploe, M., Van Belle, E., Mc Fadden, E.P. (1998): Randomized multicenter comparison of conventional anticoagulation versus anti-platelet therapy in unplanned and elective coronary stenting. *Circulation*. 98, 1597-1603.
- 19) Bertrand, M.E., Rupprecht, H.J., Urban, P., Gerschlick, A.H., for the CLASSICS Investigators (2000): Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting. *Circulation*. 102, 624-29.
- 20) Beumer, S., Ijsseldijk, M.J., de Groot, P.G., Sixma, J.J. (1994): Platelet adhesion to fibronectin in flow: dependence on surface concentration and shear rate, role of platelet membrane glycoproteins GP IIb/IIIa and VLA-5, and inhibition by heparin. *Blood*. 84, 3724-33.
- 21) Blanks, J.E., Moll, T., Eytner, R., Vestweber, D. (1998): Stimulation of P-selectin glycoprotein ligand-1 on mouse neutrophils activates β 2-integrin mediated attachment to ICAM-1. *Eur. J. Immunol.* 28, 433-43.
- 22) Boneu, B., Destelle, G. (1996): Platelet anti-aggregation activity and tolerance of clopidogrel in atherosclerotic patients. *Thromb. Haemost.* 76, 939-13.
- 23) Born, G.V.R. (1962): Quantitative investigation into the aggregation of blood platelets. *J. Physiol.* 26, 1812-22.
- 24) Brass, L.F., Pizarro, S., Ahuja, M., Belmonte, E., Blanchard, N., Stadel, J.M., Hoxie, J.A. (1994): Changes in the structure and function of the human thrombin receptor during receptor activation, internalization, and recycling. *J. Biol. Chem.* 269, 2943-52.
- 25) Buerke, M., Pittroff, W., Meyer, J., Darius, H. (1995): Aspirin therapy: optimized platelet inhibition with different loading and maintenance doses. *Am. Heart. J.* 130, 465-72.
- 26) Buttrum, S.M., Hatton, R., Nash, G.B. (1993): Selectin-mediated rolling of neutrophils on immobilized platelets. *Blood* 82, 1165-74.
- 27) Cairns, J.A., Gent, M., Singer, J., Finnie, K.J., Froggatt, G.M., Holder, D.A., Jablonsky, G., Kostuk, W.J., Melendez, L.J., Myers, M.G., Sackett, D.L., Sealey, B.J., Tanser, P.H. (1985): Aspirin, sulfinpyrazone, or both in unstable angina: results of a Canadian multicenter trial. *N. Engl. J. Med.* 313, 1369-75.
- 28) Cannon, C.P., McCabe, C.H., Wilcox, R.G., Langer, A., Caspi, A., Berink, P., Lopez-Sendon, J., Toman, J., Charlesworth, A., Anders, R.J., Alexander, J.C., Skene, A., Braunwald, E. (2000): Oral glycoprotein IIb/IIIa inhibition with orbofiban in patients with unstable coronary syndromes (OPUS-TIMI 16) trial. *Circulation*. 102, 149-56.
- 29) Caplain, H., Cariou, R. (1999): Long term activity of clopidogrel: a three-month appraisal in healthy volunteers. *Semin. Thromb. Haemost.* 25, 21-23.
- 30) Caplain, H., Donat, F., Gaud, C., Necciari, J. (1999): Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin. Thromb. Haemost.* 25, 25-28.
- 31) Cardinal, D.C., Flower, R.J. (1980): The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behaviour in blood. *J. Pharmacol. Methods*. 3, 135-58.
- 32) Cattaneo, M., Akkawat, B., Kinlough-Rathbone, R.L., Packham, M.A., Cimminiello, C., Mannucci, P.M. (1994): Ticlopidine facilitates the deaggregation of human platelets aggregated by thrombin. *Thromb. Haemost.* 71, 91-94.
- 33) Cattaneo, M., Akkawat, B., Lecchi, A., Cimminiello, C., Capitanio, A.M., Mannucci, P.M. (1991): Ticlopidine selectively inhibits human platelet response to adenosin diphosphate. *Thromb. Haemost.* 66, 694-99.
- 34) Cattaneo, M., Gachet, C. (1999): ADP receptors and clinical bleeding disorders. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2281-85.

- 35) Cerletti, C., Evangelista, V., Molino, M., de Gaetano G. (1995): Platelet activation by polymorphnuclear leukocytes: role of cathepsin G and P-selectin. *Thromb. Haemost.* 74, 218-23.
- 36) Cerletti, C., Evangelista, V., de Gaetano, G. (1999): P-selectin-b2-integrin cross-talk: a molecular mechanism for polymorphnuclear leukocyte recruitment at the site of vascular damage. *Thromb. Haemost.* 82, 787-93.
- 37) Chang, C.P., Zhao, J., Wiedmer, T., Sims, P.J. (1993): Contribution of platelet microparticle formation of the transmembrane migration of phosphatidylserine. *J. Biol. Chem.* 268, 7171-78.
- 38) Chronos, N.A., Goodall, A.H., Wilson, D.J., Sigwart, U., Buller, N.P. (1993): Profound platelet degranulation is an important side effect of some types of contrast media used in interventional cardiology. *Circulation.* 88, 2035-44
- 39) Clemetson, K.J., Wenger, R.H., Wicki, A.N., Clemetson, J.M., Kieffer, N., Drouin, J. (1990): Molecular biology of human platelet membrane glycoprotein Ib. *Prog. Clin. Biol. Res.* 356, 77-88.
- 40) Coller, B.S. (1992): Platelets in cardiovascular thrombosis and thrombolysis. *In*: Fozzard, H.A. (Ed.): *The Heart and Cardiovascular System*. 2nd. Ed.; 219-73. Baltimore, Ravens Press.
- 41) Coller, B.S. (1997): Platelet GP IIb/IIIa antagonists: the first anti-integrin receptor therapeutics. *J. Clin. Invest.* 99, 1467-71.
- 42) Coller, B.S., Peerschke, E.I., Scudder, L.E., Sullivan, C.A. (1983): A murine monoclonal antibody that completely blocks the binding of fibrinogen to platelets produces a thrombastenic-like state in normal platelets and binds to glycoproteins IIb and / or IIIa. *J. Clin. Invest.* 72, 325-38.
- 43) Colman, R.W., Cook, J.J., Niewiarowski, S. (1994): Mechanisms of platelet aggregation. *In*: Colman, R.W., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hirsh, J. (Eds.): *Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3. Ed.; S. 508-23. Philadelphia: Lippincott.
- 44) Colman, R.W., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hirsh, J. (1994): Overview of hemostasis. *In*: Colman, R.W., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hirsh, J. (Eds.): *Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice*. 3. Ed.; S. 3-18. Philadelphia: Lippincott.
- 45) Coughlin, S.R. (1999): How the protease thrombin talks to cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 11023-27.
- 46) Cramer, E.M., Savidge, G.F., Vainchenker, W., Berndt, M.C., Pidard, D., Caen, J.P., Masse, J.M., Breton-Gorius, J. (1990): Alpha-granule pool of glycoprotein IIb-IIIa in normal and pathologic platelets and megakaryocytes. *Blood.* 75, 1220-27.
- 47) Cunningham, J.G., Meyer, S.C., Fox, J.E.B. (1996): The cytoplasmic domain of the α -subunit of glycoprotein (GP) Ib mediates attachment of the entire GP Ib-IX complex to the cytoskeleton and regulates von Willebrand Factor-induced changes in cell morphology. *J. Biol. Chem.* 271, 11581-87.
- 48) Damsky, C.H., Werb, Z. (1992): Signal transduction by integrin receptors for extracellular matrix: cooperative processing of extracellular information. *Curr. Opinion Cell Biol.* 4, 772-81.
- 49) Daniel, J.L., Dangelmaier, C., Jin, J., Ashby, B., Smith, J.B., Kunapuli, S.P. (1998): Molecular basis for ADP-induced platelet activation. I. Evidence for three distinct ADP receptors on human platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 2024-29.
- 50) Davies, M.J. (2000): The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart.* 83, 361-66.
- 51) Defreyn, G., Gachet, C., Savi, P., Driot, F., Cazenave, J.P., Maffrand, J.P. (1991): Ticlopidine and clopidogrel (SR 25990C) selectively neutralize ADP inhibition of PGE1-activated platelet adenylate cyclase in rats and rabbits. *Thromb. Haemost.* 65, 186-90.
- 52) Dehmer, G.J., Nichols, T.C., Bode, A.P., Liles, D., Sigman, J., Li, S., Koch, G., Tate, D.A., Griggs, T.R. (1997): Assessment of platelet activation by coronary sinus blood sampling during balloon angioplasty and directional coronary atherectomy. *Am. J. Cardiol.* 80, 871-77.

- 53) Dennington, P.M., Berndt, M.C. (1994): The thrombin receptor. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 21, 349-58.
- 54) Derry, S., Loke, Y.K. (2000) Risk of gastrointestinal haemorrhage with long-term use of aspirin: meta analysis. *Br. Med. J.* 321, 1183-87.
- 55) Desager, J.P. (1994): Clinical pharmacokinetics of ticlopidine. *Clin. Pharmacokinet.* 26, 347-55.
- 56) Diacovo, T.G., Roth, S.J., Buccola, J.M., Bainton, D.F., Springer, T.A. (1996): Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the β 2-integrin CD 11b/CD 18. *Blood*. 88, 146-57.
- 57) Diaz-Ricart, M., Tandon, N.N., Gomez-Ortiz, G., Carretero, M., Escolar, G., Ordinas, A., Jamieson, G.A. (1996): Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16, 883-88.
- 58) Dong, J.F., Sae-Tung, G., López, J.A. (1997): Role of glycoprotein V in the formation of the platelet high-affinity thrombin-binding site. *Blood*. 89, 4355-63.
- 59) Du, X., Ginsberg, M.H. (1997): Integrin alpha IIb beta 3 and platelet function. *Thromb. Haemost.* 78, 96-100.
- 60) Eeden, S.F., Klut, M.E., Walker, B.A.M., Hogg, J.C. (1999): The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J. Immunol. Methods*. 232, 23-43.
- 61) Engler, R.L. (1989): Free radical and granulocyte-mediated injury during myocardial ischemia and reperfusion. *Am. J. Cardiol.* 63, 19E-23E.
- 62) Erbel, R., Haude, M., Höpp, H.W., Franzen, D., Rupprecht, H.J., Heublein, B., Fischer, K., deJaegere, P., Serruys, P., Rutsch, W., Probst, P., for the REST-Study group (1998): Coronary-artery stenting compared with balloon angioplasty for restenosis after initial balloon angioplasty. *N. Engl. J. Med.* 339, 1672-78.
- 63) Evangelista, V., Manarini, S., Rotondo, S., Martelli, N., Polischuk, R., McGregor, J., deGaetano, G., Cerletti, C. (1996): Platelet / polymorphnuclear leukocyte interaction in dynamic conditions: evidence of adhesion cascade and cross talk between P-selectin and the β 2 integrin CD 11b/CD 18. *Blood*. 88, 4283-94.
- 64) Evangelista, V., Manarini, S., Sideri, R., Rotondo, S., Martelli, N., Piccoli, A., Totani, L., Piccardoni, P., Vestweber, D., de Gaetano, G., Cerletti, C. (1999): Platelet / polymorphonuclear leukocyte interaction: P-selectin triggers protein-tyrosine phosphorylation-dependent CD11b / CD18 adhesion: role of PSGL-1 as a signaling molecule. *Blood*. 93, 876-85.
- 65) Falciani, M., Gori, A.M., Fedi, S., Chiarugi, L., Simonetti, I., Dabizzi, R.P., Prisco, D., Pepe, G., Abbate, R., Gensini, G.F., Neri Serneri, G.G. (1998): Elevated tissue factor and tissue factor pathway inhibitor circulating levels in ischaemic heart disease patients. *Thromb. Haemost.* 79, 495-99.
- 66) Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., Davie, E.W. (1992): Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 10729-32.
- 67) Febbraio, M., Silverstein, R.L. (1990): Identification and characterization of LAMP-1 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *J. Biol. Chem.* 265, 18531-37.
- 68) Felding-Habermann, B., Ceresi, D.A. (1993): Vitronectin and its receptors. *Current Opinion Cell Biol.* 5, 864-68.
- 69) Fogelson, A.L., Wang, N.T. (1996): Platelet dense-granule centralization and the persistence of ADP secretion. *Am. J. Physiol.* 270, H1131-40.
- 70) Forlow, S.B., McEver, R.P., Nollert, M.U. (2000): Leukocyte-leukocyte interactions mediated by platelet microparticles under flow. *Blood*. 95, 1317-23.

- 71) Foster, A., Prosser, D.M., Agans, J.M., Zhai, Y., Smith, M.D., Lachowicz, J.E., Zhang, F.L., Gustafson, E., Monsma, F.J., Wiekowski, M.T., Abbondanzo, S.J., Cook, D.N., Bayne, M.L. Lira, S.A., Chintala, M.S. (2001) Molecular identification and characterization of the platelet ADP-receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J. Clin. Invest.* 107, 1591-98.
- 72) Frelinger, A.L., Du, X., Plow, E.F., Ginsberg, M.H. (1991): Monoclonal antibodies to ligand-occupied conformers of integrin α IIb β 3 (glycoprotein IIb-IIIa) alter receptor affinity, specificity, and function. *J. Biol. Chem.* 266, 17106-11.
- 73) French, P., McGregor, J.L., Berruyer, M., Belleville, J., Touboul, P., Dawes, J., Dechavanne, M. (1985): Comparative evaluation of plasma thrombospondin beta-thromboglobulin and platelet factor 4 in acute myocardial infarction. *Thromb. Res.* 39, 619-24.
- 74) Fritsma, G., Engelmann, G., Yousuf, M. (1981): A review of platelet function and testing. *Am. J. Med. Technol.* 47, 723-27.
- 75) Frojmovic, M.M., Milton, J.G., Gear, A.L. (1989): Platelet aggregation measured in vitro by microscopic and particle counting. *Methods. Enzymol.* 169, 134-49.
- 76) Fukuda, M. (1991): Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* 266, 21327-30.
- 77) Furie, B., Furie, B.C. (1995): The molecular basis of platelet and endothelial cell interaction with neutrophils and monocytes. Role of P-selectin and the P-selectin ligand PSGL-1. *Thromb. Haemost.* 74, 224-27.
- 78) Furman, M.I., Liu, L., Benoit, S.E., Becker, R.C., Barnard, M.R., Michelson, A.D. (1998): The cleaved peptide of the thrombin receptor is a strong platelet agonist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 3082-87.
- 79) Gachet, C., Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Leray, C., Ohlmann, P., Cazenave, J.P. (1997): Activation of ADP receptors and platelet function. *Thromb. Haemost.* 78, 271-75.
- 80) Gasperetti, C.M., Gonias, S.L., Gimple, L.W., Powers, E.R. (1993): Platelet activation during coronary angioplasty in humans. *Circulation.* 88, 2728-34.
- 81) Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Rüdiger, S., Schömig, A. (1996): Changes in membrane glycoproteins of circulating platelets after coronary stent implantation. *Heart.* 76, 166-72.
- 82) Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., May, A., Rüdiger, S., Schömig, A. (1997): Role of activation-dependent platelet membrane glycoproteins in development of subacute occlusive coronary stent thrombosis. *Coron. Artery. Dis.* 8, 121-28.
- 83) Gawaz, M., Neumann, F.J., Ott, I., Schiessler, A., Schömig, A. (1996): Platelet function in acute myocardial infarction treated with direct angioplasty. *Circulation.* 93, 229-37.
- 84) Gawaz, M., Ruf, A., Pogatsa-Murray, G., Dickfeld, T., Rüdiger, S., Taubitz, W., Fischer, J., Müller, I., Meier, D., Patscheke, H., Schömig, A. (2000): Incomplete inhibition for platelet aggregation and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of GP IIb/IIIa receptors. *Thromb. Haemost.* 83, 915-20.
- 85) Geiger, J., Brich, J., Honig-Liedl, P., Eigenthaler, M., Schanzenbacher, P., Herbert, J.M., Walter, U. (1999): Specific impairment of human platelet P2Y(AC) ADP receptor-mediated signalling by the antiplatelet drug clopidogrel. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2007-11.
- 86) Ginsberg, M.H., Xiaoping, D., O'Toole, T.E., Loftus, J.C., Plow, E.F. (1993): Platelet integrins. *Thromb. Haemost.* 70, 87-93.
- 87) Gutensohn, K., Beythien, C., Bau, J., Meinertz, T., Kuehn, P. (1997): Flow cytometric analysis of coronary stent-induced alterations of platelet antigens in an in vitro model. *Thromb. Res.* 86, 49-56.

- 88) Hamamoto, K., Ohga, S., Nomura, S., Yasunaga, K. (1994): Cellular distribution of CD63 antigen in platelets and in three megakaryocytic cell lines. *Histochem. J.* 26, 367-75.
- 89) Hamm, C.W., Heeschen, C., Goldmann, B., Vahanian, A., Adgey, J., Macaya, M.C., Rutsch, W., Berger, J., Kootstra, J., Simoons, M.L. (1999): Benefit of abciximab in patients with refractory unstable angina in relation to serum troponin T levels. *N. Engl. J. Med.* 340, 1623-29.
- 90) Hamsten, A., Wiman, B., DeFaire, U., Blomback, M. (1985): Increased plasma levels of a rapid inhibitor of tissue plasminogen activator in young survivors of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 313, 1557-63.
- 91) Harrington, R.A., Kleiman, N.S., Kottke-Marchant, K., Lincoff, A.M., Tcheng, J.E., Sigmon, K.N., Joseph, D., Rios, G., Trainor, K., Rose, D., et al. (1995): Immediate and reversible platelet inhibition after intravenous administration of a peptide glycoprotein IIb/ IIIa inhibitor during percutaneous coronary intervention. *Am. J. Cardiol.* 76, 1222-27.
- 92) Harrison, P., Cramer, E.M. (1993): Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* 7, 52-62.
- 93) Hass, W.K., Easton, J.D., Adams, H.P., Pryse-Phillips, W., Molony, B.A., Anderson, S., Kamm, B. (1989): A randomized trial comparing ticlopidine hydrochloride with aspirin for the prevention of stroke in high-risk patients. Ticlopidine Aspirin Stroke Study Group. *N. Engl. J. Med.* 321, 501-7.
- 94) Hato, T., Pampori, N., Shattil, S.J. (1998): Complementary roles for receptor clustering and conformational changes in the adhesive and signalling functions of integrin α IIb β 3. *J. Cell. Biol.* 141, 1685-95.
- 95) Haude, M., Erbel, R., Issa, H., Straub, U., Ruprecht, H.J., Treese, N., Meyer, J. (1993): Subacute thrombotic complications after intracoronary implantation of Palmaz-Schatz stents. *Am. Heart. J.* 126, 15-22.
- 96) Haude, M., Erbel, R., Straub, U., Dietz, U., Schatz, R., Meyer, J. (1991): Results on intracoronary stents for management of coronary dissection after balloon angioplasty. *Am. J. Cardiol.* 67, 691-96.
- 97) Hechler, B., Leon, C., Vial, C., Vigne, P., Frelin, C., Cazenave, J.P., Gachet, C. (1998): The P2Y1 receptor is necessary for ADP-induced platelet aggregation. *Blood.* 92, 152-59.
- 98) Heptinstall, S., May, J.A., Glenn, J.R., Sanderson, H.M., Dickinson, J.P., Wilcox, R.G. (1995): Effects of ticlopidine administered to healthy volunteers on platelet function in whole blood. *Thromb. Haemost.* 74, 1310-15.
- 99) Hickey, M.J., Hagen, F.S., Yagi, M., Roth, G.J. (1993): Human platelet glycoprotein V: characterization of the polypeptide and the related Ib-V-IX receptor system of adhesive, leucine-rich glycoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90, 8327-31.
- 100) Hidari, K.I., Weyrich, A.S., Zimmermann, G.A., McEver, R.P. (1997): Engagement of P-selectin glycoprotein ligand-1 enhances tyrosine phosphorylation and activates mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 272, 28750-56.
- 101) Hollopeter, G., Jantzen, H.-J. Vincent, D., Li, G., England, L., Ramakrishnan, V., Yang R.B., Nurden, P., Nurden, A., Julius, D., Conley, P.B. (2001): Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombotic drugs. *Nature.* 409, 202-7.
- 102) Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K., Walter, U. (1994): Phosphorylation of the focal adhesion protein VASP at serine 157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur. J. Biochem.* 225, 21-27.
- 103) Hourdille, P., Heilmann, E., Combrie, R., Winckler, J., Clemetson, K.J., Nurden, A.T. (1990): Thrombin induces a rapid redistribution of glycoprotein Ib-IX complexes within the membrane systems of activated human platelets. *Blood.* 76, 1503-13.

- 104) Isenberg, W.M., McEver, R.P., Schuman, M.A., Bainton, D.F. (1986): Topographic distribution of a granule membrane protein (GMP-140) that is expressed on the platelet surface after activation: an immunogold-surface replica study. *Blood Cells*. 12, 191-204.
- 105) Ishii-Watabe, A., Uchida, E., Mizuguchi, H., Tayakawa, T. (2000): On the mechanism of plasmin-induced platelet aggregation. *Biochem. Pharmacol.* 59, 1345-55.
- 106) ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group (1988): Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet*. 2, 349-60.
- 107) Israels, S.J., McMillan, E.M., Robertson, C., Singhory, S., McNicol, A. (1996): The lysosomal granule membrane protein, LAMP-2, is also present in platelet dense granule membranes. *Thromb. Haemost.* 75, 623-29.
- 108) Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Nurden, A.T. (1987): Human gamma-thrombin: lack of correlation between a platelet functional response and glycoprotein V hydrolysis. *Thromb. Haemost.* 58, 915-20.
- 109) Janzon, L., Bergqvist, D., Boberg, J., Boberg, M., Eriksson, I., Lindgarde, F., Persson, G., Almgren, B., Fagher, B., Kjellstrom, T. (1990): Prevention of myocardial infarction and stroke in patients with intermittent claudication; effects of ticlopidine. Results from STIMS, the Swedish Ticlopidine Multicentre Study. *J. Intern. Med.* 227, 301-8.
- 110) Jarvis, G.E., Humphries, R.G., Robertson, M.J., Leff, P. (2000): ADP can induce aggregation of human platelets via both P2Y(1) and P(2T) receptors. *Br. J. Pharmacol.* 129, 275-82.
- 111) Jin, J., Daniel, J.L., Kunapuli, S.P. (1998): Molecular basis for ADP-induced platelet activation, II: the P2Y1 receptor mediates ADP-induced intracellular calcium mobilization and shape change in platelets. *J. Biol. Chem.* 273, 2030-34.
- 112) Jin, J., Kunapuli, S.P. (1998): Coactivation of two different G protein-coupled receptors is essential for ADP-induced platelet aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 8070-74.
- 113) Kahn, M.L., Nakanishi-Matsui, M., Shapiro, M.J., Ishihara, H., Coughlin, S.R. (1999): Protease-activated receptors 1 and 4 mediate activation of human platelets by thrombin. *J. Clin. Invest.* 103, 879-87.
- 114) Kamikura, Y., Wada, H., Yamada, A., Shimura, M., Hiyoyama, K., Shiku, H., Tanigawa, M., Nishikawa, H., Yamada, N., Isaka, N., Nakano, T., Kumeda, K., Kato, H. (1997): Increased tissue factor pathway inhibitor in patients with acute myocardial infarction. *Am. J. Hematol.* 55, 183-87.
- 115) Kaplan, K.L., Owen, J. (1981): Plasma levels of beta-thromboglobulin and platelet factor 4 as indices of platelet activation in vivo. *Blood*. 57, 199-202.
- 116) Kastrati, A., Schühlen, H., Hausleiter, J., Walter, H., Zitzmann-Roth, E., Hadamitzky, M., Elezi, S., Ulm, K., Dirschinger, J., Neumann, F.J., Schömig, A. (1997): Restenosis after coronary stent placement and randomization to a 4-week combined antiplatelet or anticoagulant therapy. *Circulation*. 96, 462-67.
- 117) Kehrel, B., Wierwille, S., Clemetson, K.J., Anders, O., Steiner, M., Knight, C.G., Farndale, R.W., Okuma, M., Barnes, M.J. (1998): Glycoprotein VI is a major collagen receptor for platelet activation: it recognizes the platelet activating quaternary structure of collagen, whereas CD36, glycoprotein IIb/IIIa, and von Willebrand factor do not. *Blood*. 91, 491-99.
- 118) Kereiakes, D.J., Kleiman, N.S., Ambrose, J., Cohen, M., Rodriguez, S., Palabrica, T., Herrman, H.C., Sutton, J.M., Weaver, W.D., McKee, D.B., Fitzpatrick, V., Sax, F.L. (1996): Randomized, placebo controlled dose-ranging study of Tirofiban (MK-383) platelet IIb/IIIa blockade in high risk patients undergoing coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 536-44.

- 119) Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D.W., Guccione, M.A., Rand, M.L., Packham, M.A. (1993): Degranulation of human platelets by the thrombin receptor peptide SFLLRN: comparison with degranulation by thrombin. *Thromb. Haemost.* 70, 1019-23.
- 120) Kirchhofer, D., Riederer, M.A., Baumgartner, H.R. (1997): Specific accumulation of circulating monocytes and polymorphnuclear leukocytes on platelet thrombi in a vascular injury model. *Blood*. 89, 1270-78.
- 121) Klinkhardt, U., Kirchmaier, C.M., Westrup, Graff, J., Mahnel, R., Breddin, H.K., Harder, S. (2000): Ex vivo - in vitro interaction between aspirin, clopidogrel, and the GP IIb/IIIa inhibitors abciximab and SR121566A. *Clin. Pharmacol. Ther.* 67, 305-13.
- 122) Kogaki, S., Sawa, Y., Sano, T., Matsushita, T., Ohata, T., Kurotobi, S., Tojo, S.J., Matsuda, H., Okada, S. (1999): Selectin on activated platelets enhances neutrophil endothelial adherence in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 43, 968-73.
- 123) Kolarov, P., Tschöpe, D., Nieuwenhuis, H.K., Gries, F.A., Strauer, B., Schultheiss, H.P. (1996): PTCA: periprocedural platelet activation. Part II of the Düsseldorf PTCA platelet study. *Eur. Heart. J.* 17, 1216-22.
- 124) Kroll, M.H., Hellums, J.D., McIntyre, L.V., Schafer, A.I., Moake, J.L. (1996): Platelets and shear stress. *Blood*. 88, 1525-41.
- 125) Kuzniar, J., Splawinska, B., Malinga, K., Mazurek, A.P., Splawinski, J. (1996): Pharmacodynamics of ticlopidine: relation between dose and time of administration to platelet inhibition. *Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.* 34, 357-61.
- 126) Lefer, A.M., Cambell, B., Scalia, R., Lefer, D.J. (1998): Synergism between platelets and neutrophils in provoking cardiac dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circulation*. 98, 1322-28.
- 127) Leon, M.B., Baim, D.S., Popma, J.J., Gordon, P.C., Cutlip, D.E., Ho, K.K., Giambartolomei, A., Diver, D.J., Lasorda, D.M., Williams, D.O., Pocock, S.J., Kuntz, R.E. (1998): A clinical trial comparing three antithrombotic-drug regimens after coronary stenting. *N. Engl. J. Med.* 339, 1665-71.
- 128) Lewis, H.D., Davis, J.W., Archibald, D.G., Steinke, W.E., Smitherman, T.C., Doherty, J.E., Schnaper, H.W., LeWinter, M.M., Linares, E., Pouget, J.M., Sabharwal, S.C., Chesler, E., DeMots, H. (1983): Protective effects of aspirin against acute myocardial infarction and death in men with unstable angina. *N. Engl. J. Med.* 309, 396-403.
- 129) Li, N., Goodall, A.H., Hjerdah, P. (1999): Efficient flow cytometric assay for platelet-leukocyte aggregates in whole blood using fluorescence signal triggering. *Cytometry*. 35, 154-161.
- 130) Lindahl, T.L., Festin, R., Larsson, A. (1992): Studies of fibrinogen binding to platelets by flow cytometry: an improved method for studies of platelet activation. *Thromb. Haemost.* 68, 221-25.
- 131) Link, B., Schwerdt, H., Berg, G., Link, A., Maurer, U., Neher, G., Schieffer, H. (1998): Neutrophil adhesion and activation during systemic thrombolysis in acute myocardial infarction. *Thromb. Res.* 91, 183-90.
- 132) Liu, L., Freedman, J., Hornstein, A., Fenton, J.W., Ofori, F.A. (1994): Thrombin binding to platelets and their activation in plasma. *Br. J. Haematol.* 88, 592-600.
- 133) Loftus, J.C., Liddington, R.C. (1997): Cell adhesion in vascular biology: new insights into integrin-ligand interaction. *J. Clin. Invest.* 99, 2302-306.
- 134) Lynch, J.J., Cook, J.J., Sitko, G.R., Holahan, M.A., Ramjit, D.R., Mellott, M.J., Stranieri, M.T., Stabilito, I.I., Zhang, G., Lynch, R.J. (1995): Nonpeptide glycoprotein IIb/IIIa inhibitors. 5. Antithrombotic effects of MK-0383. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 20-32.

- 135) MacKenzie, A.B., Mahaut-Smith, M.P., Sage, S.O. (1996): Activation of receptor-operated cation channels via P2X1 not P2T purinoceptors in human platelets. *J. Biol. Chem.* 271, 2879-81.
- 136) Mascelli, M.A., Lance, E.T., Damaraju, L., Wagner, C.L., Weisman, H.F., Jordan, R.E. (1998): Pharmacodynamic profile of short-term abciximab treatment demonstrates prolonged platelet inhibition with gradual recovery from GP IIb/IIIa receptor blockade. *Circulation.* 97, 1680-88.
- 137) Matzdorff, A.C., Berchner, D., Kuhnel, G., Kemkes-Matthes, B., Pralle, H., Voss, R. (1998): Relative and absolute changes of activated platelets, microparticles and platelet aggregates after activation in vitro. *Haemostasis.* 28, 277-88.
- 138) Matzdorff, A.C., Kemkes-Matthes, B., Voss, R., Pralle, H. (1996): Comparison of beta-thromboglobulin, flow cytometry, and platelet aggregometry to study platelet activation. *Haemostasis.* 26, 98-106.
- 139) May, A.E., Neumann, F.J., Gawaz, M., Ott, I., Walter, H., Schömig, A. (1997): Reduction of monocyte-platelet interaction and monocyte activation in patients receiving antiplatelet therapy after coronary stent implantation. *Eur. Heart. J.* 18, 1913-20.
- 140) Mazzucato, M., De Marco, L., Masotti, A., Pradella, P., Bahou, W.F., Ruggeri, Z.M. (1998): Characterization of the initial α -thrombin interaction with glycoprotein Ib in relation to platelet activation. *J. Biol. Chem.* 273, 1880-87.
- 141) McEver, R.P. (1990): Properties of the GMP-140, an inducible granule membrane protein of platelets and endothelium. *Blood Cells.* 16, 73-83.
- 142) McEver, R.P., Cummings, R.D. (1997): The role of PSGL-1 binding to selectins in leukocyte recruitment. *J. Clin. Invest.* 100, 485-92.
- 143) Metzelaar, M.J., Clevers, H.C. (1992): Lysosomal membrane glycoproteins in platelets. *Thromb. Haemost.* 68, 378-82.
- 144) Metzelaar, M.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K. (1990): Detection of platelet activation using activation specific monoclonal antibodies. *Blood Cells.* 16, 85-93.
- 145) Metzelaar, M.J., Wijngaard, P.L., Peters, P.J., Sixma, J.J., Nieuwenhuis, H.K., Clevers, H.C. (1991): CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells. *J. Biol. Chem.* 266, 3239-45.
- 146) Meyer, S.C., Fox, J.E. (1995): Interaction of platelet glycoprotein V with glycoprotein Ib-IX regulates expression of the glycoproteins and binding of von Willebrand factor to glycoprotein Ib-IX in transfected cells. *J. Biol. Chem.* 270, 14693-99.
- 147) Michelson, A.D. (1996): Flow cytometry: a clinical test of platelet function. *Blood* 87, 4925-36.
- 148) Michelson, A.D. (1994): Platelet activation by thrombin can be directly measured in whole blood through the use of the peptide GPRP and flow cytometry: methods and clinical applications. *Blood. Coagul. Fibrinolysis.* 5, 121-31.
- 149) Michelson, A.D., Barnard, M.R. (1987): Thrombin-induced changes in platelet membrane glycoproteins Ib, IX, and IIb-IIIa complex. *Blood.* 70, 1673-78.
- 150) Michelson, A.D., Benoit, S.E., Kroll, M.H., Li, J.M., Rohrer, M.J., Kestin, A.S., Barnard, M.R. (1994): The activation-induced decrease in the platelet surface expression of the glycoprotein Ib-IX complex is reversible. *Blood.* 83, 3562-73.
- 151) Mills, D.C., Puri, R., Hu, C.J., Minniti, C., Grana, G., Freedman, M.D., Colman, R.F., Colman, R.W. (1992): Clopidogrel inhibits the binding of ADP analogues to the receptor mediating inhibition of platelet adenylate cyclase. *Arterioscler. Thromb.* 12, 430-36.
- 152) Mishkel, G.J., Aguirre, F.V., Ligon, R.W., Rocha-Singh, K.J., Lucore, C.L. (1999): Clopidogrel as adjunctive antiplatelet therapy during coronary stenting. *J. Am. Coll. Cardiol.* 24, 1884-90.

- 153) Modderman, P.W., Admiraal, L.G., Sonnenberg, A., von dem Borne, A.E. (1992): Glycoproteins V and Ib-IX form a noncovalent complex in the platelet membrane. *J. Biol. Chem.* 267, 364-69.
- 154) Molino, M., Bainton, D.F., Hoxie, J.A., Coughlin, S.R., Brass, L.F. (1997): Thrombin receptors on human platelets. Initial localization and subsequent redistribution during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 272, 6011-17.
- 155) Molino, M., Di Lallo, M., Martinelli, N., de Gaetano, G., Cerletti, C. (1993): Effects of leukocyte derived cathepsin G on platelet membrane glycoprotein Ib-IX and IIb-IIIa complexes: a comparison with thrombin. *Blood* 83, 2442-51.
- 156) Monkovic, D.D., Tracy, P.B. (1990): Functional characterization of human platelet-released factor V and its activation by factor Xa and thrombin. *J. Biol. Chem.* 265, 17132-40.
- 157) Morgenstern, E. (1999): Morphologie der Thrombozyten. In: Müller-Berghaus, G., Pötzsch, B. (Hrsg.): *Hämostaseologie*. S. 3-14. Berlin, Heidelberg, New York: Springer.
- 158) Moshfegh, K., Redondo, M., Julmy, F., Wuillemin, W.A., Gebauer, M.U., Haeberli, A., Meyer, B.J. (2000): Antiplatelet effects of clopidogrel compared with aspirin after myocardial infarction: enhanced inhibitory effects of combination therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 699-705.
- 159) Moussa, I., Oetgen, M., Roubin, G., Colombo, A., Wang, X., Iyer, S., Maida, R., Collins, M., Kreps, E., Moses, J.W. (1999): Effectiveness of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin in preventing stent thrombosis after coronary stent implantation. *Circulation* 99, 2364-6.
- 160) Müller, C., Büttner, H.J., Petersen, J., Rosskamm H. (2000): A randomized comparison of clopidogrel and aspirin versus ticlopidine and aspirin after placement of coronary-artery stents. *Circulation*. 101, 590-93.
- 161) Mustard, J.F., Packham, M.A., Kinlough-Rathbone, R.L., Perry, D.W., Regoeczi, E. (1978): Fibrinogen and ADP-induced platelet aggregation. *Blood*. 52, 453-66.
- 162) Nagata, K., Tsuji, T., Todoroki, N., Katagiri, Y., Tanoue, K., Yamazaki, H., Hanai, N., Irimura, T. (1993): Activated platelets induce superoxide anion release by monocytes and neutrophils through P-selectin (CD62). *J. Immunol.* 151, 3267-73.
- 163) Nakamura, T., Jamieson, G.A., Okuma, M., Kambayashi, J.I., Tandon, N.N. (1998): Platelet adhesion to native type I collagen fibrils: role of GPVI in divalent cation-dependent and independent adhesion and thromboxane A2 generation. *J. Biol. Chem.* 273, 4338-44.
- 164) Nesheim, M.E., Pittman, D.D., Wang, J.H., Slonosky, D., Giles, A.R., Kaufman, R.J. (1988): The binding of 35S-labeled recombinant factor VIII to activated and unactivated human platelets. *J. Biol. Chem.* 263, 16467-70.
- 165) Neumann, F.J., Marx, N., Gawaz, M., Brand, K., Ott, I., Rokitta, C., Sticherling, C., Meinl, C., May, A., Schömig, A. (1997): Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation*. 95, 2387-94.
- 166) Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Puchner, G., Schömig, A. (1996): Neutrophil and platelet activation at balloon-injured coronary artery plaque in patients undergoing angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 27, 819-24.
- 167) Neumann, F.J., Ott, I., Gawaz, M., Richardt, G., Holzapfel, H., Jochum, M., Schömig, A. (1995): Cardiac release of cytokine and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*. 92, 748-55.
- 168) Neumann, F.J., Ott, I., Wilhelm, A., Katus, H., Tillmanns, H., Schömig, A. (1994): Release of chemoattractants and neutrophil activation in acute myocardial infarction immediately after successful recanalization of the infarct-related vessel by angioplasty. *Eur. Heart. J.* 15, 171-78.

- 169) Nguyen, G., Horellou, M.H., Kruithof, E.K., Conard, J., Samama, M.M. (1988): Residual plasminogen activator inhibitor activity after venous stasis as a criterion for hypofibrinolysis: a study in 83 patients with confirmed deep vein thrombosis. *Blood*. 72, 601-5.
- 170) Nicholson, N.S., Panzer-Knodle, S.G., Salyers, A.K., Taite, B.B., Szalony, J.A., Haas, N.F., King, L.W., Zablocki, J.A., Keller, B.T., Broschat, K., et al. (1995): SC-54684A: an orally active inhibitor of platelet aggregation. *Circulation*. 91, 403-10.
- 171) Nieuwenhuis, H.K., van Oosterhout, J.J.G., Rozemuller, E., van Iwaarden, F., Sixma, J.J. (1987): Studies with a monoclonal antibody against activated platelets: evidence that a secreted 53,000-molecular weight lysosomal-like granule protein is expressed on the surface of activated platelets. *Blood*. 70, 838-45.
- 172) Niewiarowski, S., Holt, J.C., Cook, J.J. (1994): Biochemistry and physiology of secreted platelet proteins. In: Colman, R.W., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hirsh, J. (Eds.): Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. 3. Ed.; S. 546-63. Philadelphia: Lippincott.
- 173) Nurden, A.T., Poujol, C., Durrieu-Jais, C., Nurden, P. (1999): Platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors: basic and clinical aspects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19, 2835-40.
- 174) Ofosu, F.A., Liu, L., Freedman, J. (1996): Control mechanisms in thrombin generation. *Semin. Thromb. Hemost.* 22, 303-8.
- 175) O'Neill, W.W., Serruys, P., Knudtson, M., van Es, G.A., Timmis, G.C., van der Zwaan, C., Kleiman, J., Gong J, Roecker EB, Dreiling R, Alexander J, Anders R for the EXCITE Investigators (2000): Long-term treatment with a platelet glycoprotein-receptor antagonist after percutaneous coronary revascularization. *N Engl J Med.* 342, 1316-24.
- 176) Ott, I., Neumann, F.J., Gawaz, M., Schmitt, M., Schömig, A. (1996): Increased neutrophil-platelet adhesion in patients with unstable angina. *Circulation*. 94, 1239-46.
- 177) Palabrica, T., Lobb, R., Furie, B.C., Aronovitz, M., Benjamin, C., Hsu, Y.M., Sajer, S.A., Furie, B. (1992): Leukocyte accumulation promoting fibrin deposition is mediated in vivo by P-selectin on adherent platelets. *Nature*. 359, 848-51.
- 178) Parker, R.I., Gralnick, H.R. (1988): Effect of aspirin on platelet-von Willebrand factor surface expression on thrombin and ADP-stimulated platelets. *Blood*. 74, 2016-21.
- 179) Patrono, C., Collar, B., Dalen, J., Fuster, V., Gent, M., Harker, L., Hirsh, J., Roth, G. (1998): Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects. *Chest*. 114, 470S-78S.
- 180) Peters, M.J., Heyderman, R.S., Hatch, D.J., Klein, N.J. (1997): Investigation of platelet-neutrophil interactions in whole blood by flow cytometry. *J. Immunol. Methods*. 209, 125-35.
- 181) Phillips, D.R., Charo, I.F., Scarborough, R.M. (1991): GP IIb/IIIa: the responsive integrin. *Cell*. 65, 359-62.
- 182) Poole, A., Gibbins, J.M., Turner, M., van Vugt, M.J., van de Winkel, J.G., Saito, T., Tybulewicz, V.L., Watson, S.P. (1997): The Fc receptor gamma-chain and the tyrosine kinase Syk are essential for activation of mouse platelets by collagen. *EMBO J.* 16, 2333-41.
- 183) Pribluda, V., Rotman, A. (1982): Dynamics of membrane-cytoskeleton interactions in activated blood platelets. *Biochemistry*. 21, 2825-32.
- 184) Pytela, R., Pierschbacher, M.D., Ginsberg, M.H., Plow, E.F., Ruoslahti, E. (1986): Platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa: member of a family of Arg-Gly-Asp-specific adhesion receptors. *Science*. 231, 1559-62.
- 185) Quinn, M.J., Fitzgerald, D.J. (1999): Ticlopidine and Clopidogrel. *Circulation*. 100, 1667-72.
- 186) Ragni, M., Golino, P., Cirillo, P., Scognamiglio, A., Piro, O., Esposito, N., Battaglia, C., Botticella, F., Ponticelli, P., Ramunno, L., Chiariello, M. (2000): Endogenous tissue factor pathway inhibitor modulates

- thrombus formation in an in vivo model of rabbit carotid artery stenosis and endothelial injury. *Circulation*. 102, 113-17.
- 187) Riede, U.N., Schaefer, H.E. (1993): Arterien. In: Riede, U.N., Schaefer, H.E. (Hrsg.): Allgemeine und spezielle Pathologie; 3. Auflage; S. 463-63. Stuttgart: Thieme Verlag.
 - 188) Rinder, C.S., Student, L.A., Bonan, J.L., Rinder, H.M., Smith, B.R. (1993): Aspirin does not inhibit adenosine diphosphate-induced platelet alpha-granule release. *Blood*. 82, 505-12.
 - 189) Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A., Smith, B.R. (1991): Activated and unactivated platelet adhesion to monocytes and neutrophils. *Blood*. 78, 1760-69.
 - 190) Rinder, H.M., Bonan, J.L., Rinder, C.S., Ault, K.A., Smith, B.R. (1991): Dynamics of leukocyte-platelet adhesion in whole blood. *Blood*. 78, 1730-37.
 - 191) Ruggeri, Z.M. (1993): Mechanisms of shear-induced platelet adhesion and aggregation. *Thromb. Haemost.* 70, 119-23.
 - 192) Rupprecht, H.J., Darius, H., Borkowski, U., Voigtländer, T., Nowal, B., Genth, S., Meyer, J. (1998): Comparison of antiplatelet effects of aspirin, ticlopidine and their combination after stent implantation. *Circulation*. 97, 1046-52.
 - 193) Savi, P., Beauverger, P., Labouret, C., Delfaud, M., Salel, V., Kaghad, M., Herbert, J.M. (1998): Role of P2Y1 purinoceptor in ADP-induced platelet activation. *FEBS Lett.* 422, 291-95.
 - 194) Savi, P., Combalbert, J., Gaich, C., Rouchon, M.C., Maffrand, J.P., Berger, Y., Herbert, J.M. (1994): The antiaggregating activity of clopidogrel is due to a metabolic activation by the hepatic cytochrome P450-1A. *Thromb. Haemost.* 72, 313-17.
 - 195) Savi, P., Pereillo, J.M., Uzabiaga, M.F., Combalbert, J., Picard, C., Maffrand, J.P., Pascal, M., Herbert, J.M. (2000): Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb. Haemost.* 84, 891-96.
 - 196) Scarborough, R.M., Naughton, M.A., Teng, W., Rose, J.W., Phillips, D.R., Nannizzi, L., Arfsten A., Campbell, A.M., Charo, I.F. (1993): Design of potent and specific integrin antagonists. Peptide antagonists with high specificity for glycoprotein IIb-IIIa. *J. Biol. Chem.* 268, 1066-73.
 - 197) Scharf, R.E., Tomer, A., Marzec, U.M., Teirstein, P.S., Ruggeri, Z.M., Harker, L.A. (1992): Activation of platelets in blood perfusing angioplasty-damaged coronary arteries. Flow cytometric detection. *Arterioscler. Thromb.* 12, 1475-87.
 - 198) Schmitz, G., Rothe, G., Ruf, A., Barlage, S., Tschöpe, D., Clemetson, K.J., Goodall, A.H., Michelson, A.D., Nurden, A.T., Shankey, T.V. (1998): European working group on clinical cell analysis: consensus protocol for the flow cytometric characterisation of platelet function. *Thromb. Haemost.* 79, 885-96.
 - 199) Schömig, A., Neumann, F.J., Kastrati, A., Schühlen, H., Blasini, R., Hadamitzky, M., Walter, H., Zitzmann-Roth, E.M., Richardt, G., Alt, E., Schmitt, C., Ulm, K. (1996): A randomised comparison of antiplatelet and anticoagulant therapy after the placement of coronary-artery stents. *N. Engl. J. Med.* 334, 1084-89.
 - 200) Schwartz, A., Marti, G.E., Poon, P., Gratama, J.W., Fernandez-Repollet, E. (1998): Standardizing flow cytometry: a classification system of fluorescence standards used for flow cytometry. *Cytometry*. 33, 106-114.
 - 201) Selak, M.A., Chignard, M., Smith, J.B. (1988): Cathepsin G is a strong platelet agonist released by neutrophils. *Biochem. J.* 251, 293-99.
 - 202) Serrano, C.V., Ramires, J.A., Venturinelli, M., Arie, S., D'Amico, E., Zweier, J.L., Pileggi, F., da Luz, P.L. (1997): Coronary angioplasty results in leukocyte and platelet activation with adhesion molecule

- expression. Evidence of inflammatory responses in coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 29, 1276-83.
- 203) Serruys, P.W., de Jaegere, P., Kiemeneij, F., et al. for the Benestent Study Group (1994): A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. *N. Engl. J. Med.* 331, 489-95.
 - 204) Shapiro, H.M. (1994): *Practical Flow Cytometry*. 3. Ed.. New York: Wiley-Liss.
 - 205) Shattil, S.J. (1995): Function and regulation of the $\beta 3$ integrins in haemostasis and vascular biology. *Thromb. Haemost.* 74, 149-55.
 - 206) Shattil, S.J. (1999): Signalling through platelet integrin $\alpha \text{IIb}\beta 2$: inside-out, outside-in, and sideways. *Thromb. Haemost.* 82, 318-25.
 - 207) Shattil, S.J., Cunningham, M., Hoxie, J.A. (1987): Detection of activated platelets in whole blood using activation-dependent monoclonal antibodies and flow cytometry. *Blood* 70, 307-15.
 - 208) Shattil, S.J., Hoxie, J.A., Cunningham, M., Brass, L.F. (1985): Changes in the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex during platelet activation. *J. Biol. Chem.* 260, 11107-14.
 - 209) Silverstein, R.L., Nachman, R.L. (1987): Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion. *J. Clin. Invest.* 79, 867-74.
 - 210) Simon, D.I., Xu, H., Orllepp, S., Rogers, C., Rao, N.K. (1997): 7E3 monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa cross-reacts with the leukocyte integrin Mac-1 and blocks adhesion to fibrinogen and ICAM-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 528-35.
 - 211) Sims, P.J., Ginsberg, M.H., Plow, E.F., Shattil, S.J. (1991): Effect of platelet activation on the conformation of the plasma membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 266, 7345-52.
 - 212) Sonnenberg, A., Modderman, P.W., Hogervorst, F. (1988): Laminin receptor on platelets is the integrin VLA-6. *Nature*. 336, 487-89.
 - 213) Staatz, W.D., Rajpara, S.M., Wayner, E.A., Carter, W.G., Santoro, S.A. (1989): The membrane glycoprotein Ia-IIa (VLA-2) complex mediates the Mg^{++} -dependent adhesion of platelets to collagen. *J. Cell. Biol.* 108, 1917-24.
 - 214) Stary, H.C., Chandler, A.B., Dinsmore, R.E., Fuster, V., Glagov, S., Insull, W., Rosenfeld, M.E., Schwartz, C.J., Wagner, W.D., Wissler R.W. (1995): A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. *Circulation*. 92, 1355-74.
 - 215) Steering Committee of the Physicians' Health Study Research Group (1989): Final report on the aspirin component of the ongoing Physicians' Health Study. *N. Engl. J. Med.* 321, 129-35.
 - 216) Storey, R.F., Sanderson, H.M., White, A.E., May, J.A., Cameron, K.E., Heptinstall S. (2000): The central role of the P2T receptor in amplification of human platelet activation, aggregation, secretion and procoagulant activity. *Br. J. Haematol.* 110, 925-34.
 - 217) Sugidachi, A., Asai, F., Yoneda, K., Iwamura, R., Ogawa, T., Otsuguro, K., Koike, H. (2001): Antiplatelet action of R-99224, an active metabolite of a novel thienopyridine-type Gi-linked P2T antagonist, CS-747. *Br. J. Pharmacol.* 132, 47-54.
 - 218) Takano, S., Kimura, J., Matsuoka, I., Ono, T. (1999): No requirement of P2X1 purinoceptors for platelet aggregation. *Eur. J. Pharmacol.* 372, 305-9.
 - 219) Takeshita, S., Isshiki, T., Ochiai, M., Ishikawa, T., Nishiyama, Y., Fusano, T., Toyozumi, H., Kondo, K., Ono, Y., Sato, T. (1997): Systemic inflammatory responses in acute coronary syndrome: increased activity observed in polymorphonuclear leukocytes but not T lymphocytes. *Atherosclerosis*. 135, 187-92.

- 220) Tam, S.H., Sassoli, P.M., Jordan, R.E., Nakada, M.T. (1998): Abciximab (ReoPro, chimeric 7E3 Fab) demonstrates equivalent affinity and functional blockade of glycoprotein IIb/IIIa and $\alpha v\beta 3$ integrins. *Circulation*. 98, 1085-91.
- 221) Tandon, N.N., Kralisz, U., Jamieson, G.A. (1989): Identification of GPIV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion. *J. Biol. Chem.* 264, 7576-83.
- 222) Tandon, N.N., Ockenhouse, C.F., Greco, N.J., Jamieson, G.A. (1991): Adhesive functions of platelets lacking GPIV (CD36). *Blood*. 78, 2809-13.
- 223) Taub, R., Gould, R.J., Garsky, V.M., Ciccarone, T.M., Hoxie, J., Friedman, P.A., Shattil, S.J. (1989): A monoclonal antibody against the platelet fibrinogen receptor contains a sequence that mimics a receptor recognition domain of fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 264, 259-65.
- 224) Tcheng, J.E., Ellis, S.G., George, B.S., Kereiakes, D.J., Kleiman, N.S., Talley, J.D., Wang, A.L., Weisman, H.F., Califf, R.M., Topol, E.J. (1994): Pharmacodynamics of chimeric glycoprotein IIb/IIIa integrin antiplatelet antibody Fab 7E3 in high-risk coronary angioplasty. *Circulation*. 90, 1757-64.
- 225) The CAPRIE steering committee (1996): A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischemic events (CAPRIE). *Lancet*. 348, 1329-39.
- 226) The CAPTURE Investigators (1997): Randomised placebo-controlled trial of abciximab before and during intervention in refractory unstable angina. *Lancet*. 349, 1429-35.
- 227) The EPIC-Investigators (1994): Use of monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa-receptor in high risk coronary angioplasty. *N. Engl. J. Med.* 330, 956-61.
- 228) The EPILOG-Investigators (1997): Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor blockade and low-dose heparin during percutaneous coronary revascularization. *N. Engl. J. Med.* 336, 1689-96.
- 229) The EPISTENT Investigators (1998): Randomised placebo-controlled and balloon-angioplasty-controlled trial to assess safety of coronary stenting with use of platelet glycoprotein-IIb/IIIa blockade. *Lancet*. 352, 87-92.
- 230) The ERASER Investigators (1999): Acute platelet inhibition with abciximab does not reduce in-stent restenosis. *Circulation*. 100, 799-806.
- 231) The IMPACT-II Investigators (1997): Randomised placebo-controlled trial of effect of eptifibatide on complications of percutaneous coronary intervention: IMPACT-II. *Lancet*. 349, 1422-28.
- 232) The Medical Research Council's General Practice Research Framework (1998): Thrombosis Prevention Trial: randomised trial of low-intensity oral anticoagulation with warfarin and low-dose aspirin in the primary prevention of ischaemic heart disease in men at increased risk. *Lancet*. 351, 233-41.
- 233) The PRISM-Investigators (1998): A comparison of aspirin plus tirofiban with aspirin plus heparin for unstable angina. *N. Engl. J. Med.* 338, 1498-505.
- 234) The PRISM-Plus Investigators (1998): Inhibition of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor with tirofiban in unstable angina and non-Q-wave myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 338, 1488-97.
- 235) The PURSUIT Investigators (1998): Inhibition of platelet glycoprotein IIb/IIIa with eptifibatide in patients with acute coronary syndromes. *N. Engl. J. Med.* 339, 436-43.
- 236) The RESTORE Investigators (1997): Effects of platelet glycoprotein IIb/IIIa blockade with tirofiban on adverse cardiac events in patients with unstable angina or acute myocardial infarction undergoing coronary angioplasty. *Circulation*. 96, 1445-53.
- 237) The SYMPHONY Investigators (2000): Comparison of sibrافiban with aspirin for prevention of cardiovascular events after acute coronary syndromes: a randomised trial. *Lancet*. 355, 340-49.
- 238) Thebault, J.J., Kieffer, G., Cariou, R. (1999): Single-dose pharmacodynamics of clopidogrel. *Semin. Thromb. Haemost.* 25, 3-8.

- 239) Thebault, J.J., Kieffer, G., Lowe, G., Nimmo, W.S., Cariou, R. (1999): Repeated-dose pharmacodynamics of clopidogrel in healthy subjects. *Semin. Thromb. Haemost.* 25, 9-14.
- 240) Topol E.J. for the EPIC-Investigators (1994): Randomised trial of coronary intervention with antibody against platelet IIb/IIIa integrin for reduction of clinical restenosis: results at six months. *Lancet.* 343, 881-86.gp
- 241) Topol, E.J., Byzova, T.V., Plow, E.F. (1999): Platelet GP IIb-IIIa blockers. *Lancet.* 353, 277-31.
- 242) Tschöpe, D., Schultheiss, H.P., Kolarov, P., Schwippert, B., Dannehl, K., Nieuwenhuis, H.K., Kehrel, B., Strauer, B., Gries, F.A. (1993): Platelet membrane activation markers are predictive for increased risk of acute ischemic events after PTCA. *Circulation.* 88, 37-42.
- 243) Urban, P., Macaya, C., Rupprecht, H.J., Kiemeneij, F., Emanuelsson, H., Fontanelli, A., Pieper, M., Wesseling, T., Sagnard, L. (1998): Randomized evaluation of anticoagulation versus anti-platelet therapy after coronary stent implantation in high-risk patients. *Circulation.* 98, 2126-32.
- 244) Van de Loo, A., Nauck, M., Noory, E., Just, H., Wollschläger, H. (1998): Enhancement of platelet inhibition of ticlopidine plus aspirin vs aspirin alone given prior to elective PTCA. *Eur. Heart J.* 19, 96-102.
- 245) Vassallo, R.R., Kieber-Emmons, T., Cichowski, K., Brass, L.F. (1992): Structure-function relationships in the activation of platelet thrombin receptors by receptor-derived peptides. *J. Biol. Chem.* 267, 6081-85
- 246) Waksman, R., Bhargava, B., Mintz, G.S., Mehran, R., Lansky, A.J., Satler, L.F., Pichard, A.D., Kent, K.M., Leon, M.B. (2000): Late total occlusion after intracoronary brachytherapy for patients with in-stent restenosis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 36, 65-68.
- 247) Waller, B.F. (1983): Early and late morphologic changes in human coronary arteries after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Clin. Cardiol.* 6, 363-72.
- 248) Waller, B.F., Fry, E.T., Peters, T.F., Hermiller, J.B., Orr, C.M., VanTassel, J., Pinkerton, C.A. (1996): Abrupt (< 1 day), acute (< 1 week), and early (< 1 month) vessel closure at the angioplasty site. Morphologic observations and causes of closure in 130 necropsy patients undergoing coronary angioplasty. *Clin. Cardiol.* 19, 857-68.
- 249) Watson, S.P. (1999): Collagen receptor signaling in platelets and megakaryocytes. *Thromb. Haemost.* 82, 365-76.
- 250) Weber, A.A., Reimann, S., Shrör, K. (1999): Specific inhibition of ADP-induced platelet aggregation by clopidogrel in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 126, 415-20.
- 251) Weber, C., Springer, T.A. (1997): Neutrophil accumulation on activated, surface-adherent platelets in flow is mediated by interaction of Mac-1 with fibrinogen bound to alphaIIb beta3 and stimulated by platelet-activating factor. *J. Clin. Invest.* 100, 2085-93.
- 252) Weisel, J.W., Nagaswami, C., Vilaire, G., Bennett, J.S. (1992): Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb/IIIa complex and its interactions with fibrinogen and other ligands by electron microscopy. *J. Biol. Chem.* 267, 16637-43.
- 253) Wencel-Drake, J.D., Plow, E.F., Kunicki, T.J., Woods, V.L., Keller, D.M., Ginsberg, M.H. (1986): Localization of internal pools of membrane glycoproteins involved in platelet adhesive responses. *Am. J. Pathol.* 124, 324-34.
- 254) Weyrich, A.S., Elstad, M.R., McEver, R.P., McIntyre, T.M., Moore, K.L., Morrissey, J.H., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. (1996): Activated platelets signal chemokine synthesis by human monocytes. *J. Clin. Invest.* 97, 1525-34.

- 255) White, J.G. (1994): Anatomy and structural organization of the platelet. In: Colman, R.W., Marder, V.J., Salzman, E.W., Hirsh, J. (Eds.): Hemostasis and Thrombosis: basic principles and clinical practice. 3. Ed.; S. 397-413. Philadelphia: Lippincott.
- 256) Wilentz, J.R., Sanborn, T.A., Haudenschild, C.C., Valeri, C.R., Ryan, T.J., Faxon, D.P. (1987): Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation*. 75, 636-42.
- 257) Xiao, Z., Theroux, P., Frojmovic, M. (1999): Modulation of platelet-neutrophil interaction with pharmacological inhibition of fibrinogen binding to platelet GPIIb/IIIa receptor. *Thromb. Haemost.* 81, 281-85.
- 258) Yamaguchi, K., Nomura, S., Kido, H., Kawakatsu, T., Fukuroi, T., Suzuki, M., Hamamoto, K., Yanabu, M., Kokawa, T., Yasunaga, K. (1993): Flow cytometric analysis of changes in cytoskeletal proteins during platelet destruction and activation using a monoclonal antibody against platelet myosin. *Am. J. Hematol.* 44, 106-11.

Danksagungen

Mein Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Haude für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Etablierung der in der Studie eingesetzten Methodik zur Thrombozytenfunktionsanalytik. Herrn Prof. Dr. Raimund Erbel möchte ich dafür danken, dass ich die Untersuchungen in seiner Abteilung durchführen durfte.

Auch möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Diethelm Tschöpe und Frau Dr. Barbara Schwippert aus dem Diabetesforschungsinstitut Düsseldorf bedanken, in deren Labor ich Methodiken der Thrombozytenfunktionsanalytik erlernen durfte und die mir stets mit wissenschaftlichem Rat zu Seite standen.

Der Ernst und Berta Grimmke Stiftung und der Firma Sanofi Synthelabo möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken, ohne die der Aufbau des Labors und die Durchführung der Studie nicht möglich gewesen wären. Herrn Dr. Lothar Volbracht möchte ich für die freundliche Bereitstellung des Aggregometers danken.

Frau Dilek Böyükbas möchte ich für die hervorragende Unterstützung bei der Durchführung der Analysen im Labor danken. Auch möchte ich Schwester Monika für ihre Mithilfe bei der Patientenrekrutierung über das Aufnahmezimmer der Station M3 danken.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Dirk Welge für die intensive und stets freundschaftliche Zusammenarbeit in der Abteilung für Kardiologie und bei der Durchführung dieses Projektes danken. Von ihm bekam ich eine Vielzahl von Anregungen und eine kompetente Unterstützung in wissenschaftlicher Hinsicht.

Neben Herrn Priv. Doz. Dr. Michael Haude und Herrn Dr. Dirk Welge möchte ich Herrn Prof. Dr. Martin C. Michel für die sorgfältige und kritische Durchsicht des Manuskriptes danken.

Ein ganz herzlicher Dank gilt meinen Eltern, Hannelore und Dr. Klaus-Peter Altmann, sowie meiner Frau Daniela Altmann-Herzog, die mir stets hilfreich zur Seite standen und ohne deren Unterstützung diese Dissertation wohl nicht zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Name: Altmann
Vorname: Christoph
Geburtsdatum/-ort: 11.09.71 in Wanne-Eickel (jetzt Herne)
Familienstand: Seit 1999 verheiratet mit Daniela Altmann-Herzog, ein Kind.

Schulbildung:

1977-1981 Grundschule in Herne
1981-1991 Gymnasium Wanne (Herne)
1987-1988 Austauschschüler an der Nooksack Valley High School in Everson, Washington (USA)

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

1991-1992 Zivildienstleistender im Pflegedienst (St. Josefs Krankenhaus Herne und Evangelisches Krankenhaus Herne).

Hochschulbildung:

10/92 Beginn des Medizinstudiums an der Universität Essen
8/94 Ärztliche Vorprüfung
3/96 1. Staatsexamen
3/98 2. Staatsexamen
4/98 - 4/99 Praktisches Jahres am Universitätsklinikum Essen (Wahlfach Anästhesie).
5/99 3. Staatsexamen

Ärztliche Tätigkeit:

08/99 – 01/2001 Arzt im Praktikum am Zentrum für Innere Medizin (Abteilung für Kardiologie) der Universität Essen.

01.02.2001: Approbation als Arzt
02 - 04/2001 Assistenzarzt am Zentrum für Innere Medizin der Universität Essen.
Seit 01.04.2001 Wissenschaftlicher Mitarbeiter im Institut für Pharmakologie der Universität Essen.